



SUOMI—FINLAND

(FI)

**Patentti- ja rekisterihallitus
Patent- och registerstyrelsen**

**[B] (11) KUULUTUSJULKAISU
UTLÄGGNINGSSKRIFT 58160**

C Patentti myönnetty 10.12.1980

(45) Patent meddelat

(51) Kv.lk.³/Int.Cl.³ G 12 Q 1/32, G 01 N 33/48

(21) Patentihakemus — Patentansökn. 750674

(22) Hakemispäivä — Ansökningsdag 07.03.75

(23) Alkuperäisyys — Giltighetsdag 07.03.75

(41) Tullut julkiseksi — Blivit offentlig 15.09.75

(44) Nähtävöksiäminen ja kuul.julkaisu pvm. —
Ansökan utlagd och utl.skriften publicerad 29.08.80

(32)(33)(31) Pyydetty etuoikeus — Begärd prioritet 14.03.74

Saksan Liittotasavalta-Föbundsrepubliken
Tyskland(DE) P 2412354.4

(71) Boehringer Mannheim GmbH., Sandhofer Strasse 112-132, D-6800 Mannheim-Waldhof, Saksan Liittotasavalta-Föbundsrepubliken Tyskland(DE)

(72) Sigmar Klose, Weilheim/Obb., August Wilhelm Wahlefeld, Weilheim/Obb., Alexander Hagen, Tutzing/Obb., Saksan Liittotasavalta-Föbundsrepubliken Tyskland(DE)

(74) Berggren Oy Ab

(54) Entsyymäattinen analyysimenetelmä - Enzymatiskt analysförfarande

Keksintö koskee analyysimenetelmää, jonka avulla voidaan määrittää entsyymäattisesti substraatteja biologisissa nesteissä, varsinkin ruumiinnesteissä kuten seerumissa.

Analytiikassa määritetään biologisissa nesteissä olevia aineosia usein seuraavan yleisen reaktiokaavan mukaan:

$S + \text{ATP} \xrightarrow{\text{spes.kinaasi}} S\text{-fosfaatti} + \text{ADP}$

$\text{ADP} + \text{PEP} \xrightarrow{\text{PK}} \text{ATP} + \text{pyruvaatti}$

$\text{pyruvaatti} + \text{NADH} \xrightarrow{\text{LDH}} \text{L-laktaatti} + \text{NAD}$

Edellä olevissa yhtälöissä merkitsee S määritettävää substraattia tai siitä aikaisemmin suoritettua entsyymäattisen reaktion avulla saatua reaktiotuotetta, ATP tarkoittaa adenosiniitritrifosfaattia, S-fosfaatti fosforyloitua substraattia tai reaktiotuotetta, ADP adosiniidifosfaattia, PEP fosfoenolipyruvaattia, PK pyruvaattikinaasia, NADH

pelkistettyä nikotiiniamidi-adeniini-dinukleotidiä, LDH laktaatti-dehydrogenaasia ja NAD hapetettua nikotiiniamidi-adeniini-dinukleotidiä.

Edellä olevassa reaktiosarjassa on ensimmäisessä reaktiossa syntyneen ADP:n määrä suoraan verrannollinen S:n tuntemattomaan määrään. Mittausuureena on NADH:n kulutus, joka mitataan rutiininomaisesti määrittämällä absorptio aleneminen aallonpituudella 340 nm, Hg 365 tai Hg 335. Edellä oleva reaktiosysteemi on yleisesti käyttökelpoinen sellaisten aineiden määrityksessä, jotka voidaan fosforyloida spesifisen kinaasin avulla ATP:llä, jolloin muodostuu ADP:tä, tai sellaisten aineiden määrityksessä, joista voidaan saada vastaavasti fosforyloituvia reaktiotuotteita.

Edellä esitettyä reaktiokaavaa käytetään erityisen suuressa määrin kliinis-kemiallisessa laboratoriossa erilaisten substraattien määritykseen, jolloin spesifisyys määrätylle substraatille saavutetaan kulloinkin spesifisen kinaasin avulla. Systeemissä on kuitenkin se varjopuoli, että biologisissa nesteissä kuten ruumiinnesteissä ja varsinkin seerumissa on säännöllisesti olemassa muita aineita, jotka myös aiheuttavat NADH:ta kuluttavan reaktion. Tämä koskee erityisesti endogeenistä pyruvaattia. Toinen syy, minkä vuoksi on otettava huomioon näytteen nollakokeen arvo, on biologisten ja ruumiinnesteiden erilainen ominaisabsorptio mainituilla aallonpituuksilla, esimerkiksi niiden bilirubiinipitoisuudesta johtuen. Tällaisia määrityksiä on sen vuoksi suoritettu tähän asti ottamalla huomioon näytteen nollakokeen arvo, josta puuttuu spesifinen kinaasi, siis fosforyloiva entsyymi. Määritettävän aineen määrä saadaan sitten vähennyslaskun avulla kummastakin rinnakkaismäärityksestä saadusta tuloksista. Varjopuolena on tällöin, että tarvitaan kaksinkertainen määrä itsessään hyvin kalliita entsyymireagensseja kuin pelkkään määritykseen tarvittaisiin ja reaktion kustannukset tulevat käytännöllisesti katsoen kaksinkertaisiksi. Epäedullista on myöskin se, että menetelmän suorittaminen kulloinkin käytettävällä analyysiautomaatilla on mahdollista vain, jos käytettävissä on kaksi mittauskanavaa.

Endogeenisten aineiden aikaansaaman virheen poistamiseksi on olemassa myös toinenkin mahdollisuus, nimittäin että poistetaan endogeeniset aineen reaktion avulla ennen spesifisen kinaasin lisäämistä ja suoritetaan NADH-kulutuksen ensimmäinen määrittäminen, sen jälkeen lisätään

spesifinen kinaasi ja määritetään uudestaan NADH-kulutus. Tämä menetelmä tulee kalliiksi ja sillä on se erikoisen suuri haitta siinä, että sitä ei yleensä voida lainkaan suorittaa tunnetuilla automaattisilla analyysilaitteilla.

Keksinnön perustana on sen vuoksi vaatimus saada aikaan menetelmä, joka on edellä kuvatun kaltainen ja jossa suoritetaan vain yksi ainoa määrittäminen ja entsyymien kulutus on siis pienempi. Sen lisäksi on tavamukaisten analyysiautomaattien sovelluttava menetelmän suoritukseen.

— Nämä vaatimukset tulevat keksinnön mukaisesti toteutetuiksi analyysimenetelmässä, jossa määritetään entsyymattisesti substraatteja biologisissa nesteissä, varsinkin seerumissa, fosforyloimalla substraatti tai siitä entsyymattisesti saatu reaktiotuote ATP:llä spesifisen kinaasin läsnäollessa, jolloin vapautuu ADP:tä, antamalla jälkimmäisen sitten reagoida fosfoenolipyruvaatin kanssa pyruvaattikinaasin läsnäollessa, jolloin muodostuu pyruvaattia, hydraamalla pyruvaatti NADH:n avulla laktaattidehydrogenaasin läsnäollessa ja mittaamalla NADH:n kulutus, ja menetelmä on tunnettu siitä, että nestenäytteen annetaan reagoida ilman spesifistä kinaasia, mutta NADH:ta regeneroivan entsyymattisen systeemin ollessa läsnä liuoksessa, reaktion kulkua varten tarvittavien reagenssien kanssa, jonka jälkeen erotetaan entsyymit puoliläpäisevän kalvon läpi reaktioliuoksesta ja lisätään suodokseen spesifinen kinaasi, pyruvaattikinaasi ja laktaattidehydrogenaasi ja suoritetaan mittaus.

— Keksinnön mukainen menetelmä soveltuu periaatteessa kaikkiin entsyymattisiin analyysimenetelmiin, joissa joko määritettävä substraatti itse tai jonkin etukäteen suoritettun entsyymattisen reaktion tuote reagoi ATP:n ja vastaavan spesifisen kinaasin kanssa ja muodostuu ADP:tä. Esimerkkinä sellaisista menetelmistä mainittakoon vapaan glyserolin määrittäminen (Klin.Wschr.40, 362 (1962), neutraalirasvan määrittäminen (Klin.Wschr.44, 262 (1966), kreatiniinin määrittäminen (Scand. J.Clin.Lab.Invest.29, Suppl, 126 (1972), glukoosin määrittäminen (Biochem.Z. 328, 499 (1957)).

Jos määritetään itse spesifisen kinaasin substraatti, esimerkiksi siinä tapauksessa, että mitataan vapaa glyseroli, niin lisätään vain tässä tapauksessa spesifistä kinaasia, siis esimerkkitapauksessa glyserolikinaasia. Jos kinaasi fosforyloi varsinaisesti määritettävästä substraatista entsyymattisesti saatua reaktiotuotetta, tarvitaan vie-

entsymaattinen reaktiosysteemi reaktiotuotteen saamiseksi substraattista menetelmän ensimmäisessä vaiheessa.

Esimerkkinä tästä mainittakoon neutraalirasvan määrittäminen (triglyseridimäärittäminen), jossa rasvojen annetaan reagoida lipaasin ja mahdollisesti esteraasin kanssa, jolloin muodostuu glyserolia ja rasvahappoa ja muodostunut glyseroli jälleen fosforyloidaan ATP:llä ja glyserolikinaasilla.

Reaktionkululle tarpeellisia reagensseja ovat paitsi jo mainitut entsyymit ATP, PEP ja NADH myös apuaineet kuten puskuriaineet, epäorgaaniset suolat, esimerkiksi magnesiumsulfaatti, mahdollisesti pinta-aktiiviset aineet ym. Kaikki nämä aineet ovat asiantuntijalle suoritettavan reaktion yhteydessä tuttuja, eikä niitä ole tarpeen tässä selostaa yksityiskohtaisesti.

NADH:ta regeneroiva entsymaattinen systeemi muodostuu olennaisesti NADH-spesifisestä dehydrogenaasista samoin kuin tämän dehydrogenaasin substraattista. Keksinnön puitteissa pidetään parhaana sellaista systeemiä, joka sisältää alkoholidehydrogenaasia ja substraattina alkoholia. Muita NADH-spesifisiä dehydrogenaaseja ja näiden substraatteja voidaan kuitenkin käyttää samalla lailla.

Puoliläpäisevänä kalvona käytetään keksinnön puitteissa kalvoa, joka pidättää valkuaisaineet, mutta päästää lävitseen pienempimolekyyliset aineet. Esimerkkeinä sopivista kalvoista mainittakoon dialyysikalvot, ultrasuodatuskalvot, käänteisosmoosissa käytettävät kalvot yms.

Kun keksinnön mukaista menetelmää suoritetaan kaupasta saatavilla analyysiautomaateilla, voidaan puoliläpäisevänä kalvona proteiinien eristämiseksi käyttää tällaisissa laitteissa säännöllisesti varusteenä olevaa dialyysilaitetta. Sen vuoksi on mahdollista suorittaa keksinnön mukainen menetelmä tällaisilla automaateilla tarvitsematta muuttaa näitä laitteita ja ilman että tarvittaisiin toista mittauskanavaa. Keksinnön tässä toteuttamismuodossa käytetään siis hyväksi periaatteessa reaktioiden suorittamista eri osastoissa, niin että entsyymaattiset reaktiot, paitsi fosforyloiminen ATP:n kanssa (spesifisen kinaasin puutteen vuoksi), tapahtuvat ensimmäisessä osastossa, ja sen jälkeen pienempimolekyyliset aineosat siirtyvät puoliläpäisevän kalvon läpi toiseen osastoon, ilman että tarvittaisiin minkäänlaisia mittauk-

sia, toisessa osastossa lisätään sitten spesifinen kinaasi, PK ja LDH, ja NADH:n kulutus mitataan fotometrisesti. Puoliläpäisevä kalvo estää myös NADH:ta regeneroivan systeemin toimimasta, koska tähän tarvittava dehydrogenaasi erottuu pois, tällöin vastaa mitattu NADH-kulutus yksinomaan fosforyloidun substraatin määrää, sillä häiritsevät reaktiot on suljettu pois. Näin vältettyjen häiritsevien reaktioiden merkitys tulee selvästi näkyviin, jos esimerkiksi verrataan seerumissa tavallisesti esiintyviä pyruvaattikonsentraatioita erilaisten, seerumissa normaalisti esiintyvien ja edellä selostetun menetelmän mukaan määritettävien aineiden konsentraatioihin:

Seerumissa esiintyvä aineosa	Konsentraatio normaalialue (mM)	Pyruvaatin pitoisuus prosentteissa laskettuna substraatista
Pyruvaatti	0,05-0,07	---
Triglyseridit	0,8 -1,94	3-10 %
vapaa glyseroli	0,03-0,145	30-200 %
kreatiniini	0,07-0,13	40-100 %

Edellä olevasta taulukosta käy ilmi, että yksinomaan pyruvaatin aiheuttama häiriö saattaa olla moninkertaisesti suurempi kuin substraatin mittausarvo. Lisäksi on otettava huomioon, että biologisissa nesteissä esiintyy useissa tapauksissa myös muita häiritseviä aineita kuten bilirubiinia, joiden vaikutus voidaan samoin poistaa keksinnön mukaisen menetelmän avulla. Tämän seikan todistamiseksi liuotettiin seerumiin lisääntyviä määriä (aina 10 mg/100 ml kohti) bilirubiinia. Glyserolipitoisuuden määrittäminen antoi sellaista reagenssiseosta käyttäen sekä bilirubiinin kanssa että ilman bilirubiinia samat arvot. Kun jätettiin pois NADH:ta regeneroiva systeemi, saatiin noin 10 % korkeampia mittausarvoja, jotka johtuivat endogeenisestä pyruvaattipitoisuudesta, mutta olivat yllättäen käytännöllisesti katsoen riippumattomia bilirubiinikonsentraatiosta. Keksinnön mukaisen menetelmän avulla poistetaan sen vuoksi myös häiriöitä, jotka johtuvat biologisen nesteen omasta värisävystä. Ei tiedetä, mihin tämä efekti perustuu.

Kun näytteen nollakokeen arvon määrittäminen ei ole enää pakollista, alenee kal-
liiden entsyymien käyttö jopa 50 % ja samalla voidaan säilyttää mene-
telmän automaattinen suoritustapa ja sen lisäksi on vielä mahdollista
työskennellä sellaisilla analyysiautomaateilla, joissa on ainoastaan
yksi mittauskanava. Analyysiautomaateissa, joissa on kaksi mittaus-
kanavaa, voidaan toinen mittauskanava pitää vapaana toisille määrityk-

sille ja sen lisäksi käsittely tulee helpommaksi ja yksinkertaisemmaksi, koska säästytään ajalliselta, elektroniselta ja optiselta kahden analyysiautomaattikanavan tasaukselta.

Keksinnön avulla voidaan poistaa myös häiriöt, jotka aiheutuvat suuri-molekyylisten proteiinien pitoisuudesta, jotka hajoittavat voimakkaasti valoa ja antavat tällä tavoin vääriä valoabsorption arvoja, esimerkiksi voimakkaasti lipeemisissä seerumeissa.

Keksinnön mukaisessa menetelmässä on saatu erikoisen hyviä tuloksia käytettäessä etanolia ja alkoholidehydrogenaasia NADH:ta regeneroivana systeeminä, kun etanolikonsentraatio oli vähintään 2 g/100 ml puskuria ja ADH-konsentraatio vähintään 180 IU/ml. Tässä tapauksessa osoittautui sopivaksi erityisesti trietanoliamiini-puskuri 0,05-0,2 M, pH 7-8.

Seuraavat esimerkit valaisevat keksintöä lähemmin.

Esimerkki 1

Glyserolin määrittäminen

Määrittäksessä käytettiin vesipitoista näytettä, glyserolikonsentraatio 30 mg/100 ml. Tutkittiin pyruvaatin vaikutusta lisäämällä 2, 4, 6, 8 ja 10 mg pyruvaattia/100 ml näytettä. Määrittäminen suoritettiin toisen polven autoanalysaattorilla, amerikkalaisen firman Techniconin valmistamalla analyysiautomaatilla. Tämä laite työskentelee käyttäen jatkuvaa virtaussysteemiä ja sen vuoksi yksityisten reagenssien annostus ilmoitetaan dimensiolla ml/min. Entsyymien erottamiseen käytettiin kaupasta saatavaa dialyysikammiota, valmistaja Technicon-firma, Yhdysvallat. Näyte laimennettiin (0,05 ml/minuutissa) liuoksella, joka sisälsi trietanoliamiini-puskuria, 0,1 M, pH = 7,6, NADH (0,025 mM), ATP (0,13 mM), PEP (0,04 mM), magnesiumsulfaattia (1,0 mM), etanolia (2 g/100 ml), ja entsyymejä LDH (1,6 IU/ml), PK (0,3 IU/ml) samoin kuin ADH (180 IU/ml) virtausnopeudella 0,8 ml/min. Dialysoidaan liuosta vastaan, joka sisältää trietanoliamiinipuskuria, 0,1 M, pH 7,6, NADH (0,1 mM), ATP (0,53 mM), PEP (0,18 mM), magnesiumsulfaattia (1,0 mM), LDH (6,4 IU/ml), PK (1 IU/ml), virtausnopeuden ollessa 0,6 ml/min.

Dialysaattiin sekoitettiin glyserokinaasin liuos (2 IU/ml) 7,5 mM:ssa magnesiumsulfaattia) virtausnopeus 0,1 ml/min. Mitattiin ekstinktion pieneneminen ilmoitettuna asteikonosina 7,5 minuutin inkubaatioajan jälkeen lämpötilassa 37°C. Tulokset on koottu taulukkoon 1.

Taulukko 1

Näyte	Lisätty pyruvaattia mg/100 ml	Pyruvaatin vaikutus glyserolin määritykseen				
		Sarake 1 seerumin nollakoe- arvon kanssa	Sarake 2 ilman seerumin ilman NADH:ta regeneroivaa systeemiä	Sarake 3 Keksinnön mukaisesti		
		Asteikon osat	Havait- tiin %	Asteikon osat	%	Asteikon osat %
Näyte 1	-	72	100	73	101	71,5
"	2	72	100	78	108	72
"	4	74	102,7	81,5	113	72,5
"	6	72,5	100,6	86	119	72,5
"	8	73	101	91,5	127	72
"	10	72	100	96,5	134	71
						99,3
						100
						100,6
						100,6
						100
						98,6

Näyte 1 sisältää 30,0 mg glyserolia 100 ml:ssa kahdesti
tislattua vettä.

Taulukosta 1 käy ilmi, että vain keksinnön mukainen menetelmä (sarake 3), jossa käytetään yhtä mittauskanavaa, antaa yhtäpitäviä arvoja oikeana pidetyn 2-kanavamenetelmän kanssa, jossa otetaan näytteen nollakoe-arvo huomioon (sarake 1).

Esimerkki 2

Neutraalirasvan määrittäminen ihmisen seerumista.

Otettiin ihmisen seerumia näytteiksi ja lisättiin niihin pyruvaattia 2, 4, 6, 8 ja 10 mg/100 ml. Työskenneltiin kuten esimerkissä 1 on selostettu laitteiden suhteen. Liuoksissa on seuraavia aineosia ja niitä pumpattiin seuraavalla virtausnopeudella:

Näyte: 0,05 ml/min.

Liuos 1:

0,1 M trietanoliamiini-puskuria, pH = 7,8, nopeudella 0,8 ml/min, sisältäen: 0,025 mM NADH, 0,13 mM ATP, 0,04 mM PEP, 1,0 mM magnesiumsulfaattia, 2 g/100 ml etanolia, 1,6 IU LDH/ml, 0,26 IU PK/ml, 180 IU ADH/ml, 11 IU esteraasi/ml, 400 IU lipaasi/ml, 0,1 mg Na-dodekyyli-sulfaattia/ml.

Liuos 2 (dialyssaatti):

0,1 M trietanoliamiini-puskuria, pH = 7,6 nopeudella 0,6 ml/min, sisältäen: 0,1 mM NADH, 0,53 mM ATP, 0,18 mM PEP, 1,0 mM magnesiumsulfaattia, 6,4 IU LDH/ml, 1,0 IU PK/ml.

Liuos 3:

7,5 mM magnesiumsulfaattia, nopeudella 0,1 ml/min, sisältäen: 2 IU glyserokinaasia/ml.

Inkubaatioaika 7,5 min lämpötilassa 37°C.

Mittausarvot on esitetty taulukossa 2.

		Taulukko 2				
Näyte	Lisätty pyruvaattia mg/100 ml	Pyruvaatin vaikutus neutraalirasvan määritykseen				
		Sarake 1 seerumin nollakoe- arvon kanssa	Sarake 2 ilman seerumin nollakoe- arvoa ja keksinnön mukaisesti ilman NADH:ta regeneroivaa systeemiä	Sarake 3		
		Asteikon osat	Asteikon osat	Asteikon osat	Asteikon osat	%
Näyte 1	-	29	31	29	29	100
= 138 mg	2	29	35,5	29	29	100
neutraali-	4	29	39,5	29,5	29,5	102
rasvaa/100	6	28	44,5	29,0	29,0	100
ml:ssa	8	28	49	29,0	29,0	100
seerumia	10	28	53,5	29,0	29,0	100
Näyte 2	-		21,5	19	19	100
= 114 mg	2		25	19	19	100
neutraali-	4		28,5	19	19	100
rasvaa/100	6		32	19	19	100
ml:ssa	8		36,5	19	19	100
seerumia	10		40,5	19	19	100

Esimerkki 3

Muiden värillisten aineiden aiheuttamien interferenssien poistaminen.

Näyte, josta oli määritettävä neutraalirasva, sekoitettiin näytteen kanssa, jonka bilirubiinipitoisuus on korkea. (Bilirubiini on ruumiille ominainen veren väriaineen hajoamistuote ja se osoittaa aallonpituuksilla 340 tai 366 nm raja-absorption, maksimi on aallonpituudella 450 nm). Muuten olivat koeolosuhteet samat kuin esimerkissä 2 sil-
lällä erolla, että kontrollin vuoksi mitattiin koesarjassa, sarake 3 ilman kinaasia (glyserokinaasia).

Tulokset ovat taulukossa 3.

Näyte	Lisätty bilirubiinia (mg/100 ml)	Taulukko 3					
		Muiden väriainesten aineiden vaikutus					
		Sarake 1	Sarake 2	Sarake 3			
		ilman seerumin nollakoe- arvoa	ilman seerumin nollakoe- arvoa ja	keksinnön mukaisesti, mutta ilman kinaasia (GK)			
		NADH:ta regeneroivan systeemin kanssa (täydellinen)	ilman kinaasia (GK) ja NADH:ta regeneroivaa systeemiä				
		Asteikon osat	Asteikon osat	Asteikon osat	%	Asteikon osat	%
Näyte 1	0	11	1*	0	9	0	0
Näyte 2	0	18	1,7*	0	9,5	0	0
"	2	18	1,7*	0	9,5	0	0
"	5	18,5	1,7*	0	9,5	0	0
"	10	17,5	1,7*	0	9,5	0	0
Näyte 3	0	37,5	1,3*	0	3,5	0	0

*Tämä arvo esittää endogeenistä pyruvaattia

Sarakkeessa 3 oleva havaittu määrä 0 % todistaa, ettei bilirubiinin vaikutusta ole mitattavissa.

Patenttivaatimukset

1. Analyysimenetelmä, jonka avulla voidaan määrittää entsymaattisesti substraatteja biologisissa nesteissä, varsinkin seerumissa fosforyloimalla substraatti tai siitä entsymaattisesti saatu reaktiotuote ATP:llä spesifisen kinaasin läsnäollessa, jolloin vapautuu ADP:ta, antamalla jälkimmäisen reagoida fosfoenolipyruvaatin kanssa pyruvaattikinaasin läsnäollessa, jolloin muodostuu pyruvaattia, hydraamalla pyruvaatti NADH:n avulla laktaattidehydrogenaasin läsnäollessa ja mittaamalla NADH:n kulutus, t u n n e t t u siitä, että annetaan nestenäytteen reagoida ilman spesifistä kinaasia, mutta NADH:ta regeneroivan entsymaattisen systeemin ollessa läsnä liuoksessa reaktion kululle tarpeellisten reagenssien kanssa, jonka jälkeen erotetaan entsyymit puoliläpäisevän kalvon läpi reaktioliuoksesta, lisätään spesifinen kinaasi, pyruvaattikinaasi ja laktaattidehydrogenaasi suodokseen ja suoritetaan mittaus.

2. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että käytetään NADH:ta regeneroivaa systeemiä, joka sisältää NADH-spesifisen dehydrogenaasin ja sen substraatin.

3. Patenttivaatimuksen 2 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että käytetään alkoholidehydrogenaasia ja sen substraattina alkoholia.

4. Jonkin edellä olevan patenttivaatimuksen mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että entsyymit eristetään dialyysin, ultra-suodatuksen, käänteisosmoosin tai sentrifugoinnin avulla.

Patentkrav

1. Analysförfarande för enzymatisk bestämning av substrat i biologiska vätskor, speciellt serum, genom att fosforylera substratet eller en därur enzymatiskt erhållen reaktionsprodukt med ATP i närvaro av ett specifikt kinas, varvid ADP frigörs, och att låta det sistnämnda reagera med fosfoenolpyruvat i närvaro av pyruvatkinas, varvid pyruvat bildas, och att hydrera pyruvatet med NADH i närvaro av laktatdehydrogenas och att mäta NADH-förbrukningen, k ä n n e t e c k n a t av att vätskeprovet får rea-

gera utan närvaro av kinas med för reaktionsförloppet nödiga reagenser i närvaro av ett enzymsystem, som regenererar NADH, varefter enzymerna avskiljs genom en semipermeabel membran från reaktionslösningen, det specifika kinaset, pyruvatkinas och laktatdehydrogenas tillsättes i filtratet och mätningen utförs.

2. Förfarande enligt patentkravet 1, k ä n n e t e c k n a t av att ett NADH regenererande system används, som innehåller NADH-specifikt dehydrogenas och dess substrat.

3. Förfarande enligt patentkravet 2, k ä n n e t e c k n a t av att man använder alkoholdehydrogenas och alkohol som dess substrat.

4. Förfarande enligt något av föregående krav, k ä n n e t e c k n a t av att enzymerna avskiljs med dialys, ultrafiltrering, omvänd osmos eller genom centrifugering.

Viitejulkaisuja-Anförda publikationer

—