

PATENTSCHRIFT 142 973

Wirtschaftspatent

Erteilt gemäß § 5 Absatz 1 des Änderungsgesetzes zum Patentgesetz

In der vom Anmelder eingereichten Fassung veröffentlicht

(11)	142 973	(44)	23.07.80	Int. Cl. ³ 3(51) G 01 N 33/52
(21)	WP G 01 N / 212 465	(22)	25.04.79	

Akademie der Wissenschaften der DDR, Zentralinstitut für
Molekularbiologie, Berlin, DD

Scheller, Frieder, Dr. Dipl.-Chem.; Pfeiffer, Dorothea,
Dipl.-Biol.; Seyer, Ingrid; Riedel, Klaus, Dr. Dipl.-Biol.;
Scheller, Oda; Siepe, Martina, DD
siehe (72)

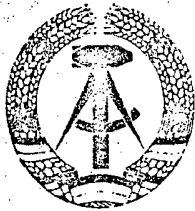
Akademie der Wissenschaften der DDR, Forschungszentrum für
Molekularbiologie und Medizin, AG Patent- und Neuererwesen,
1115 Berlin, Lindenberger Weg 70

(54) Enzymelektrode zur ATP-Bestimmung

(57) Die Erfindung bezieht sich auf eine Enzymelektrode zur ATP-Bestimmung. Sie eignet sich besonders für den Einsatz in klinischen Labors, in der Mikrobiologie und Arzneimittelforschung. Das Ziel der Erfindung besteht darin, durch die Kombination billiger Enzyme die ATP-Konzentration ohne Kofaktorverbrauch in physiologischen und mikrobiologischen Lösungen zu bestimmen. Die erfindungsgemäße Enzymelektrode ist eine O₂- oder H₂O₂-anzeigende Elektrode, die mit einer Enzymschicht versehen ist, in der die Glukoseoxidase und Hexokinase homogen oder in getrennten Schichten aufgebracht und mit einem Dialyseschlauch abgedeckt ist. In die Meßlösung wird eine definierte Glukosemenge zugegeben. Die ATP-Bestimmung ist mit dieser Elektrode einfacher und billiger durchzuführen.

6 Seiten





PATENTSCHRIFT 142 973

Wirtschaftspatent

Erteilt gemäß § 5 Absatz 1 des Änderungsgesetzes zum Patentgesetz

In der vom Anmelder eingereichten Fassung veröffentlicht

(11)	142 973	(44)	23.07.80	Int. Cl. ³ 3(51) G 01 N 33/52
(21)	WP G 01 N / 212 465	(22)	25.04.79	

Zur RS Nr. 142.973...

ist eine Zweitschrift erschienen.

(Teilweise aufgehoben gem. § 6 Abs. 1 d. Änd. Ges. z. Pat. Ges.)

Molekularbiologie und Medizin, 10. August 1980
1115 Berlin, Lindenberger Weg 70

(54) Enzymelektrode zur ATP-Bestimmung

(57) Die Erfindung bezieht sich auf eine Enzymelektrode zur ATP-Bestimmung. Sie eignet sich besonders für den Einsatz in klinischen Labors, in der Mikrobiologie und Arzneimittelforschung. Das Ziel der Erfindung besteht darin, durch die Kombination billiger Enzyme die ATP-Konzentration ohne Kofaktorverbrauch in physiologischen und mikrobiologischen Lösungen zu bestimmen. Die erfindungsgemäße Enzymelektrode ist eine O₂- oder H₂O₂-anzeigende Elektrode, die mit einer Enzymschicht versehen ist, in der die Glukoseoxidase und Hexokinase homogen oder in getrennten Schichten aufgebracht und mit einem Dialyseschlauch abgedeckt ist. In die Meßlösung wird eine definierte Glukosemenge zugegeben. Die ATP-Bestimmung ist mit dieser Elektrode einfacher und billiger durchzuführen.

6 Seiten



Enzymelektrode zur ATP-Bestimmung

Anwendungsgebiet der Erfindung

Die Erfindung betrifft eine Enzymelektrode zur Bestimmung der Konzentration von ATP. Die Enzymelektrode ist besonders für den Einsatz im klinischen Labor, in der Arzneimittelforschung sowie der Mikrobiologie geeignet, wo auf der Basis der ATP-Messung die enzymatische Aktivität von Kinasen sowie die Konzentration derer Substrate (z.B. Glyzerol, Kreatinin), die Aktivität von ATP-asen sowie deren Hemmstoffen (herzwirksame Medikamente) und die Keimzahl in physiologischen und Fermentationslösungen bestimmt werden kann.

Charakteristik der bekannten technischen Lösungen

Eine bekannte Methode zur ATP-Bestimmung beruht auf der ATP-abhängigen Lumineszenz von Luciferin in Gegenwart von Luciferase. Der Nachteil dieser Methodik liegt in dem großen apparativen Aufwand (Fluorometer) sowie dem hohen Preis von Luciferin und Luciferase.

Eine andere Methode koppelt die Reaktionen von Hexokinase und Glukose-6-Phosphatdehydrogenase, wobei das in der

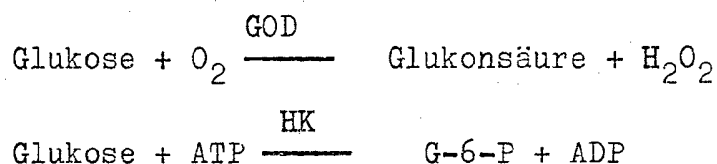
ersten Reaktion entstehende G-6-P unter Bildung von NADPH oxidiert wird. Die Messung der ATP-Konzentration erfolgt über die spektralphotometrisch gemessene NADPH-Menge. Der Nachteil dieser Methode liegt in der Notwendigkeit eines Spektralphotometers sowie des Verbrauchs von NADP in jeder Messung (Handbook of Enzymatic Methods of Analysis, G. Guilbault, M. Dekker Inc., New York 1976).

Ziel der Erfindung

Das Ziel der Erfindung ist es, durch die Kombination billiger Enzyme die ATP-Konzentration mittels Enzymelektrode ohne Kofaktorverbrauch in physiologischen und mikrobiologischen Lösungen zu bestimmen.

Darlegung des Wesens der Erfindung

Die Aufgabe der Erfindung besteht darin, durch Kombination der Enzyme Glukoseoxidase (GOD) und Hexokinase (HK) ein Signal zu erhalten, das von der ATP-Konzentration abhängt. Die Aufgabe wird mit einer Enzymelektrode dadurch gelöst, daß die beiden Enzyme gemeinsam in einer Schicht vor einer üblichen Sauerstoffelektrode angeordnet sind und der Meßlösung eine definierte Menge Glukose zugesetzt ist. In Abwesenheit von ATP tritt durch die Glukoseoxidation ein O_2 -Verbrauch auf, der der zugesetzten Glukosemenge proportional ist (Prinzip der Glukoseelektrode (F. Scheller et al., Z.med.Lab.Diagn. 18, 312(1977)). Bei Zugabe von ATP zu dieser Lösung wird ein Teil der Glukose durch die HK vor der Elektrode zu G-6-P umgesetzt, so daß eine Verkleinerung des Signals für Glukose auftritt, die von der ATP-Menge abhängt.



Die erfindungsgemäße Enzymelektrode arbeitet also ohne die Verwendung eines Kofaktors. Sie erlaubt sowohl die kontinuierliche als auch die punktweise Bestimmung der ATP-Konzentration mit einfachen Geräten (pO_2 -Meter) und ersetzt

teure Enzyme durch GOD.

Zur Bestimmung von Substraten von Kinasen ist es zweckmäßig, daß die Enzymschicht zur Glukoseoxidase und Hexokinase zusätzlich mit Glyzerol- oder Keratininkinase versehen ist.

Ausführungsbeispiele

Die Erfindung soll nachstehend an 3 Ausführungsbeispielen erläutert werden.

1. Beispiel

2000 U GOD und 300 U HK werden in 0,3 ml Lösung von 5 mg Acrylamid aufgelöst und auf einer Fläche von 8 cm² zwischen 2 Glasplatten ausgestrichen und photopolymerisiert. Ein 3x3 mm großes Filmstück wird auf der Polyäthylenfolie der Clark-Elektrode unmittelbar vor der Indikatorelektrode (Pt) plaziert. Über die Enzymschicht wird ein Dialyseschlauch mit einem O-Ring über den Elektrodenmantel gespannt. Die so präparierte Enzymelektrode taucht in die gerührte Meßlösung von 0,1 M Phosphatpuffer, pH 6 mit 10 mM MgCl₂ und ist an ein pO₂-Meter mit Schreiber angeschlossen.

Nachdem sich der Grundstrom eingestellt hat, wird eine Menge an Glukose zugegeben, sodaß die Konzentration in der Meßlösung 0,5 mM beträgt. Nach 2 Minuten ist der stationäre Stromwert erreicht und es erfolgt 8-mal die Zugabe von jeweils 0,25 mM ATP (Aufnahme der Eichkurve). Dabei tritt jeweils eine Verkleinerung des Glukosesignals ein, wobei nach dem steilen Abfall unmittelbar nach ATP-Zugabe der Übergang zu einem konstanten Gebiet erfolgt. Der Meßwert ergibt sich als Schnittpunkt der linearen Extrapolation beider Gebiete.

Zur Messung der ATP-ase-Aktivität wird eine Lösung, die 0,5 mM Glukose und 2mM ATP enthält in die Meßzelle eingefüllt. Nachdem der Strom einen konstanten Wert besitzt, wird die ATP-ase-Probe zugegeben. Durch die Enzymreaktion erfolgt ein Anstieg der Strom-Zeit-Kurve, da die ATP-Konzentration verkleinert wird. Aus der Eichkurve kann damit die ATP-ase-Aktivität errechnet werden.

Der Zusatz von ATPase-Hemmern, z.B. Ouabain, ruft eine Verkleinerung des Anstiegs hervor. Durch Variation der Inhibitor-

konzentration wird die notwendige Konzentration zur 50%igen Hemmung der ATP-ase ermittelt. Diese Größe ist ein Maß der Herzwirksamkeit von Medikamenten

2. Beispiel

Eine photopolymerisierte Enzymschicht, die nur GOD enthält, wird wie in Beispiel 1 auf die O_2 -Elektrode aufgebracht. Anschliessend wird eine zweite Polyacrylamidschicht von 100μ Dicke, die 30 U HK und 20 U Glyzerokinase je cm^2 enthält, über die GOD-Schicht gelegt und mit einem Dialyseschlauch auf der Stirnfläche des Elektrodenmantels fixiert. Diese Elektrode taucht in 5 ml temperierte Grundlösung, die 0,5 mM Glukose, 1 mM ATP und 1 mM $MgCl_2$ in 0,1 M Phosphatpuffer pH 6 enthält. Nachdem sich der Strom stabilisiert hat werden $100\mu l$ der Glyzerol-haltigen Meßprobe zugegeben. In der Enzymreaktion wird eine zur Ausgangskonzentration an Glyzerol proportionale ATP-Menge verbraucht, die aus der Änderung des Stromes über die Eichkurve bestimmt wird. Die Messung dauert 2 Minuten.

3. Beispiel

Über den Elektrodenmantel wird ein Dialyseschlauch gespannt, auf dem eine Enzymschicht mit GOD und HK (wie in Beispiel 1) mit einem zweiten Dialyseschlauch fixiert wird. Die Pt-Elektrode wird auf +600 mV gegenüber der Bezugselektrode polarisiert, sodaß die H_2O_2 -Oxidation erfaßt wird. Die Elektrode ist an einen Analogdifferenzierer angeschlossen, der den maximalen Anstieg der Strom-Zeit-Kurve anzeigt.

Der Grundstrom stellt sich in 2 ml einer Pufferlösung von pH 6 mit 0,5 mM Glukose, 1 mM $MgCl_2$ ein. Danach erfolgt die Zugabe von $50\mu l$ des Filtrates, der mit Trichloressigsäure behandelten Fermentationslösung. Die Geschwindigkeit des Stromabfalls ist der ATP-Konzentration proportional, sodaß die Keimzahl über die ermittelte ATP-Konzentration erhalten wird. Bei glukosehaltigen Meßproben wird vor der ATP-Messung mit einer nur GOD-enthaltenden Enzymelektrode die Glukosekonzentration ermittelt und bei der Auswertung berücksichtigt.

Erfindungsanspruch

1. Enzymelektrode zur Bestimmung von ATP mittels einer O_2 - oder H_2O_2 -anzeigenden Elektrode dadurch gekennzeichnet, daß die Elektrode mit einer Enzymschicht, in der Glukoseoxidase und Hexokinase homogen oder in getrennten Schichten aufgebracht und durch einen Dialyseschlauch abgedeckt ist, wobei in die Meßlösung eine definierte Menge Glukose zugesetzt ist.
2. Enzymelektrode nach Punkt 1 dadurch gekennzeichnet, daß die Enzymschicht zur Glukoseoxidase und Hexokinase zusätzlich Glyzerol- oder Kreatinkinase enthält.