DEUTSCHE DEMOKRATISCHE REPUBLIK

PATENTSCHRIFT

(12) Wirtschaftspatent

(19) DD (11) 248 605 A1

Erteilt gemäß § 17 Absatz 1 Patentgesetz

4(51) C 12 Q 1/00
C 12 Q 1/26
C 12 Q 1/48

AMT FÜR ERFINDUNGS- UND PATENTWESEN

In der vom Anmelder eingereichten Fassung veröffentlicht

(21) WP C 12 Q / 274 776 5 (22) 03.04.85 (44) 12.08.87

(71) Akademie der Wissenschaften der DDR, 1080 Berlin, Otto-Nuschke-Straße 22/23, DD
(72) Schubert, Florian, Dr. rer. nat. Dipl.-Ing., DD; Kirstein, Dieter, Dr. rer. nat. Dipl.-Chem., DD; Scheller, Frieder, Prof. Dr. rer. nat. habil. Dipl.-Chem., DD; Passarge, Margrit, Dr. rer. nat. Dipl.-Biol., DD; Appelqvist, Roger, Dipl.-Chem., SE; Gorton, Lo, Dr. Dipl.-Chem., SE; Johansson, Gillis, Prof. Dr. Dipl.-Chem., SE

(54) **Enzymelektrode und Verfahren zur Bestimmung von L-Glutamat und Transaminasenaktivität**

(57) Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, eine Enzymelektrode und ein Verfahren zur Bestimmung kleinster Mengen an Glutamat und der Aktivität von Transaminasen zu entwickeln. Erfindungsgemäß wird eine Enzymschicht, die ein L-Glutamat zu α-Ketoglutarat umwandelndes Enzym und ein α-Ketoglutarat zu L-Glutamat umwandelndes Enzym enthält, vor einer Elektrode angeordnet. Der Meßlösung wird erfindungsgemäß Alanin zugesetzt.

ISSN 0433-6461

4 Seiten

Erfindungsanspruch:

1. Enzymelektrode zur Bestimmung von L-Glutamat und Transaminasenaktivität, **dadurch gekennzeichnet,** daß eine Enzymschicht, die ein L-Glutamat und zu α-Ketoglutarat umwandeldes Enzym und ein α-Ketoglutarat zu L-Glutamat umwandelndes Enzym enthält, vor der Elektrode angeordnet ist.
2. Enzymelektrode nach Punkt 1, **dadurch gekennzeichnet,** daß als L-Glutamat zu α-Ketoglutarat umwandelndes Enzym Glutamatdehydrogenase mit $NAD(P)^+$ als Cosubstrat verwendet wird.
3. Enzymelektrode nach Punkt 1, **dadurch gekennzeichnet,** daß als L-Glutamat zu α-Ketoglutarat umwandelndes Enzym Glutamatoxidase verwendet wird.
4. Enzymelektrode nach Punkt 1, **dadurch gekennzeichnet,** daß als α-Ketoglutarat zu L-Glutamat umwandelndes Enzym Alaninaminotransferase verwendet wird.
5. Enzymelektrode nach Punkt 1 und 3, **dadurch gekennzeichnet,** daß als α-Ketoglutarat zu L-Glutamat umwandelndes Enzym Glutamatdehydrogenase mit NAD(P)H als Cosubstrat verwendet wird.
6. Enzymelektrode nach Punkt 1, 2 und 4, **dadurch gekennzeichnet,** daß die Enzymschicht vor einer mit Meldolablau (7-Dimethylamino-1,2-benzophenoxazinium Ion) modifizierten Elektrode bzw. einer üblichen Sauerstoffelektrode, deren Meßlösung einen Mediator, vorzugsweise Phenazinmethosulfat, enthält, angeordnet ist.
7. Enzymelektrode nach Punkt 1, 3, und 5, **dadurch gekennzeichnet,** daß die Enyzmschicht vor einer mit Meldolablau modifizierten Elektrode bzw. einer Sauerstoffelektrode angeordnet ist.
8. Enzymelektrode nach Punkt 1, 3, und 4, **dadurch gekennzeichnet,** daß die Enzymschicht vor einer Sauerstoffelektrode oder vor einer H_2O_2-anzeigenden Elektrode angeordnet ist.
9. Verfahren zur Bestimmung von L-Glutamat und der Transaminasenaktivität mittels einer Enzymelektrode nach Punkt 1, **dadurch gekennzeichnet,** daß der Meßlösung Alanin zugesetzt wird.

Anwendungsgebiet der Erfindung

Die Erfindung betrifft eine Enzymelektrode und ein Verfahren zur Bestimmung der Konzentration von L-Glutamat (im folgenden Glutamat) und der Aktivität von Transaminasen, wie Alaninaminotransferase und Aspartataminotransferase (im folgenden ALT und AST). Sie ist für den Einsatz in der klinischen Diagnostik, in der mikrobiologischen und Lebensmittelindustrie und in der Forschung geeignet.

Charakteristik der bekannten technischen Lösungen

Im allgemeinen wird die Konzentration von Glutamat unter Verwendung von gelöster Glutamatdehydrogenase (Gleichung 1) durch optische Messung des entstehenden NADH und NADPH (zusammengefaßt als NAD(P)H bezeichnet) bei 340 nm bestimmt.

$$\text{Glutamat} + H_2O + NAD(P)^+ \leftrightarrows \alpha\text{-Ketoglutarat} + NH_3 + NAD(P)H \quad (1)$$

Dabei tritt je Meßprobe ein hoher Enzymverbrauch auf.
Darüber hinaus wurden Enzymelektroden zur Glutamatbestimmung auf der Grundlage immobilisierter Glutamatdehydrogenase (P. Davies und K. Mosbach, Biochim. Biophys. Acta 370 [1974] 329), Glutamatdecarboxylase (M. Hikuma, H. Obana, T. Yasuda, I. Karube und S. Suzuki, Anal. Chim. Acta 131 [1981] 91) und Glutamatoxidase (H. Yamauchi, H. Kusakabe, Y. Midorikawa, T. Fujishima und A. Kuninaka, 3rd. Eur. Congr. Biotechnol. 1984, S. I–705) beschrieben. Durch die Wiederverwendbarkeit der Enzyme in diesen Dualsystemen wird eine wesentliche Verringerung des Enzymverbrauchs erreicht. Die Empfindlichkeit wird dabei, wie bei allen Enzymelektroden, einerseits durch das „Rauschen" der Anzeigeeinrichtung begrenzt. Andererseits kann maximal soviel elektrodenaktives Produkt erzeugt werden, wie Substrat (Glutamat) an das immobilisierte Enzym gelangt. Dementsprechend liegt die untere Nachweisgrenze bei den erwähnten Enzymelektroden zwischen 100 und maximal 10 µmol/l. Dadurch sind für die Messung von Glutamat in niedrig konzentrierten Lösungen große Probenvolumina erforderlich.
Sinngemäß gilt für die Bestimmung der ALT- und AST-Aktivität das Gleiche. Auch hier wurden über die materialintensiven Methoden mit gelösten Reagenzien, die auf der Messung des in der ALT-Reaktion:

$$\alpha\text{-Ketoglutarat} + \text{Alanin} \rightarrow \text{Glutamat} + \text{Pyruvat} \quad (2)$$

gebildeten Pyruvats mit Lactatdehydrogenase bzw. der Messung des in der AST-Reaktion:

$$\alpha\text{-Ketoglutarat} + \text{Aspartat} \rightarrow \text{Oxalacetat} + \text{Glutamat} \quad (3)$$

gebildeten Oxalacetats mit Malatdehydrogenase beruhen, hinaus Enzymelektroden beschrieben. Zur ALT-Bestimmung wird dabei entweder Pyruvat oder Glutamat mit der entsprechenden an der Elektrode fixierten Oxidase nachgewiesen (F. Mizutani, K. Tsuda, I. Karube, S. Suzuki und K. Matsumoto, Anal. Chim. Acta 118 [1980] 65; H. Yamauchi, H. Kusakabe, Y. Midorikawa, T. Fujishima und H. Kuninaka, 3rd. Eur. Congr. Biotechnol. 1984, S. I–705). Zur AST-Bestimmung befindet sich vor der Pyruvatoxidase-Elektrode zusätzlich Oxalacetatdecarboxylase, die die Umsetzung von Oxalacetat zu Pyruvat katalysiert (K. Kihara, E. Yasukawa und S. Hirose, Anal. Chem. 56 [1984] 1876). Die niedrigen Normalwerte für ALT und AST im Serum zusammen mit der geringen Empfindlichkeit der Enzymelektroden machen große Probenvolumina und lange Inkubations- und damit Meßzeiten notwendig.

Ziel der Erfindung

Ziel der Erfindung ist es, mit einer Enzymelektrode und einem Verfahren eine wesentlich höhere Empfindlichkeit der Glutamat- sowie der Transaminasen-Bestimmung zu erreichen und damit das notwendige Probenvolumen bzw. die Meßzeit zu reduzieren oder die Messung von Spurenmengen von Glutamat und sehr geringen Transaminase-Aktivitäten zu ermöglichen.

Darlegung des Wesens der Erfindung

Aufgabe der Erfindung ist es, eine Enzymelektrode und ein Verfahren zur quantitativen Bestimmung kleinster Mengen an Glutamat und der Aktivität von Transaminasen unter Einsatz immobilisierter Enzyme zu entwickeln, wobei die Anzeige des Substratumsatzes elektrochemisch erfolgen soll. Erfindungsgemäß wird eine Enzymschicht, die ein L-Glutamat zu α-Ketoglutarat umwandelndes Enzym nach Gleichung (1) bzw. (4)

$$\text{Glutamat} + O_2 + H_2O \rightarrow \alpha\text{-Ketoglutarat} + H_2O_2 + HN_3 \qquad (4)$$

und ein α-Ketoglutarat zu Glutamat umwandelndes Enzym nach Gleichung (2) bzw. der Rückreaktion von Gleichung (1) enthält, vor der Elektrode angeordnet.

Als L-Glutamat zu α-Ketoglutarat umwandelndes Enzym wird entweder Glutamatdehydrogenase mit $NAD(P)^+$ als Cosubstrat oder Glutamatoxidase verwendet. Als α-Ketoglutarat zu L-Glutamat umwandelndes Enzym wird zur Glutamatbestimmung ALT, zur Transaminasenaktivitätsbestimmung Glutamatdehydrogenase [mit NAD(P)H als Cosubstrat], die dann die Rückreaktion von Gleichung (1) katalysiert, verwendet.

Die bei diesen Reaktionen beteiligten Substanzen NAD(P)H, O_2 oder H_2O_2 werden zur Umsatzanzeige elektrochemisch nachgewiesen.

Erfindungsgemäß werden folgende Kombinationen von glutamat- und α-ketoglutaratumsetzenden Enzymen mit der Anzeigeelektrode realisiert:

1. Die Enzymschicht aus Glutamatdehydrogenase und ALT befindet sich vor einer mit Meldolablau chemisch modifizierten Elektrode, an der NAD(P)H angezeigt wird. Das in dieser Enzymschicht gebildete NAD(P)H kann aber auch in Anwesenheit von Phenazinmethosulfat mit einer üblichen Sauerstoffelektrode nachgewiesen werden.
2. Die Enzymschicht aus Glutamatoxidase und Glutamatdehydrogenase befindet sich entweder vor einer mit Meldolablau modifizierten Elektrode oder vor einer Sauerstoffelektrode.
3. Bei Verwendung von Glutamatoxidase und ALT wird H_2O_2 mittels einer auf +600 mV polarisierten Metallelektrode durch anodische Oxidation oder O_2 an einer Sauerstoffelektrode nachgewiesen.

Das erfindungsgemäße Verfahren ist dadurch gekennzeichnet, daß der Meßlösung Alanin zugesetzt wird.

Zur Glutamatbestimmung erfolgt in der Enzymschicht entweder die Rückführung des durch Glutamatdehydrogenase mit $NAD(P)^+$ als Cosubstrat bzw. Glutamatoxidase gebildeten α-Ketoglutarats zu Glutamat in der ALT-Reaktion [Gleichung (2)] oder die Rückführung des durch die Glutamatoxidase gebildeten α-Ketoglutarats zu Glutamat in der Rückreaktion von Glutamatdehydrogenase mit NAD(P)H als Cosubstrat [Gleichung (1)]. Letzteres findet auch zur Bestimmung der Transaminasen-Aktivität (ALT und AST) Anwendung. Hierbei wird die zu bestimmende Enzymprobe in die α-Ketoglutarat und Alanin bzw. Aspartat enthaltende Meßlösung gegeben und das entstehende Glutamat mit der Enzymelektrode, deren Enzymschicht Glutamatoxidase und Glutamatdehydrogenase enthält, bestimmt.

Die beschriebene Rezyklisierung des gebildeten α-Ketoglutarats zu Glutamat in der Enzymschicht ermöglicht den weiteren Umsatz von Glutamat zu α-Ketoglutarat in Reaktion (1) (Hinreaktion) oder (4). Dadurch wird jedes Glutamatmolekül mehrfach umgesetzt, und es entsteht wesentlich mehr NAD(P)H bzw. H_2O_2, bzw. es wird wesentlich mehr O_2 bzw. (wenn die Glutamatdehydrogenase und Glutamatoxidase enthaltende Enzymschicht verwendet wird) NAD(P)H verbraucht, als Glutamat aus der Probe in die Enzymschicht diffundiert. Durch die Beschleunigung der Reaktion wird eine beträchtliche Erhöhung der Empfindlichkeit erreicht.

Die erfindungsgemäße Enzymelektrode hat den Vorteil, daß Spurenmengen von Glutamat und sehr geringe Aktivitäten von Transaminasen, wie ALT und AST, gemessen werden können bzw. eine wesentliche Verringerung des Probenvolumens und der Meßzeit erreicht wird.

Anschließend wird die Erfindung an Beispielen näher erläutert.

Ausführungsbeispiele

Beispiel 1

Glutamatdehydrogenase und ALT werden nach dem Verfahren von F. Scheller et al. DD-PS 150 508 in einer Gelatinemembran immobilisiert. Dabei werden je cm^2 56 U Glutamatdehydrogenase und 59 U ALT eingesetzt. Eine Graphitelektrode (d = 3 mm) wird mit Meldolablau chemisch modifiziert (L. Gorton, A. Torstensson, H. Jaegfieldt und G. Johansson, J. Electroanal. Chem. 161 [1984] 103). Ein 4 mm × 4 mm großes Stück der Enzymmembran wird auf der Oberfläche der Elektrode mittels einer Dialysemembran (Dicke 20 µm) und eines O-Ringes fixiert. Diese Enzymelektrode wird in eine temperierte Meßzelle mit Magnetrührer eingesetzt, an einen Polarographen angeschlossen und auf 0,0 V gegen eine Ag/AgCl-Elektrode (0,1 M KCl) polarisiert. In der Meßzelle befinden sich 2 ml 0,1 M Phosphatpuffer, *p*H 7,4, mit 2 mM ADP, 1 mM NAD^+ und 0,1 M Alanin. Nach Einstellen des Stromgrundwertes werden jeweils 20 µl Glutamatlösungen verschiedener Konzentrationen zur Aufnahme einer Eichkurve gegeben. Die Größe des daraufhin erfolgenden Stromanstieges wird in der Eichkurve gegen die Glutamatkonzentration aufgetragen. Zur Glutamatbestimmung in einer Lebensmittelprobe wird analog zur Messung der Eichlösungen eine Probe von 20 µl in die Meßzelle gegeben und mit dem Stromanstieg aus der Eichkurve die gesuchte Glutamatkonzentration ermittelt.

Beispiel 2

Eine Enzymmembran wie in Beispiel 1 wird auf der Polyethylenmembran über der Pt-Indikatorelektrode (d = 3,5 mm) einer Sauerstoffelektrode fixiert und die Elektrode am Polarographen oder pO_2-Meter auf −0,6 V polarisiert. Die Meßlösung (2 ml) besteht aus 0,1 M Veronal-Natriumcarbonatpuffer, *p*H 8,6, mit 2 mM ADP, 1 mM $NADP^+$, 0,5 mM Phenazinmethosulfat und 0,1 M Alanin. Durch Zugabe von jeweils 10 µl von Glutamatstandardlösungen wird aus dem Stromabfall der Elektrode eine Kalibrierungskurve aufgenommen. Zur Glutamatmessung in einer mikrobiologischen Probe werden 10 µl der Probe zugegeben, und aus dem auftretenden Absinken des Stromes und der Eichkurve wird die gesuchte Konzentration erhalten.

Beispiel 3

Es wird eine Enzymmembran aus Polyacrylamid mit 59 U/cm² ALT und 40 U/cm² Glutamatoxidase hergestellt. Ein 5 mm × 5 mm großes Membranstück wird zwischen zwei Celluloseacetatmembranen (Dicke 20 µm) vor der auf +0,6 V polarisierten Pt-Indikatorelektrode (d = 0,5 mm) einer modifizierten Sauerstoffelektrode befestigt. Diese Enzymelektrode wird in eine Meßzelle wie in Beispiel 1 eingesetzt und an einen Polarographen angeschlossen, der zur Messung der ersten Ableitung des Stromes nach der Zeit auf Stellung „derivativ" geschaltet ist. In die Meßzelle werden 1,5 ml 0,1 M Phosphatpuffer, *p*H 7,0, mit 0,1 M Alanin gegeben. Hat sich ein stationärer Grundstrom eingestellt, werden jeweils 10 µl von Glutamatlösungen unterschiedlicher Konzentrationen zugegeben, und aus den kinetischen Signalen wird eine Eichkurve erstellt. Die Messung von Glutamat in Proben unbekannter Konzentration erfolgt analog wie in Beispiel 1 und 2.

Beispiel 4

Eine Enzymmembran aus Gelatine mit 40 U/cm² Glutamatoxidase und 56 U/cm² Glutamatdehydrogenase wird hergestellt und vor der Oberfläche einer modifizierten Graphitelektrode wie in Beispiel 1 fixiert.
Die Elektrode wird an einen Polarographen angeschlossen und auf 0,0 V gegen Ag/AgCl polarisiert. Die Meßlösung (2 ml) enthält 0,1 M Phosphatpuffer, *p*H 7,6, 2 mM ADP, 0,2 M Alanin, 28 mM α-Ketoglutarat und 5 mM NADH. Wenn sich ein konstanter Grundstrom eingestellt hat, werden 50 µl-Proben von Standardlösungen mit 5, 10, 20, 80 und 200 U/l Alaninaminotransferase zugegeben. Aus der Geschwindigkeit des Abfalls der Strom-Zeit-Kurve und den Enzymaktivitäten wird eine Eichkurve gebildet. Nun wird eine Serumprobe unbekannter ALT-Aktivität zugegeben, und aus der gemessenen Geschwindigkeit des Stromabfalls und der Eichkurve kann die gesuchte Aktivität ermittelt werden.

Beispiel 5

Eine Enzymmembran wie in Beispiel 4 wird hergestellt und an einer Clark-Sauerstoffelektrode wie in Beispiel 2 fixiert. Die Meßlösung besteht aus 0,1 M Phosphatpuffer, *p*H 8,0, mit 2 mM ADP, 50 mM Aspartat, 20 mM α-Ketoglutarat und 10 mM NADPH. Die Eichung mit Aspartataminotransferase enthaltenden Standardlösungen und die Messung einer Probe mit unbekannter Aspartataminotransferaseaktivität wird wie in Beispiel 4 durchgeführt. Meßsignal ist die Geschwindigkeit des dem O_2-Verbrauch entsprechenden Stromabfalls.