



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU K PATENTU

250227
(11) (B2)

[51] Int. Cl.⁴
G 01 N 31/22

[22] Přihlášeno 23 03 83

[21] [PV 1987-83]

[32] [31] [33] Právo přednosti od 26 03 82
[P 32 11 167.3]
Německá spolková republika

[40] Zveřejněno 18 09 86

[45] Vydáno 15 05 88

[72]

Autor vynálezu

LIMBACH BERTHOLD dr., HELGER ROLAND dr., DARMSTADT (NSR)

[73]

Majitel patentu

MERCK PATENT GESELLSCHAFT MIT BESCHRÄNKTER HAFTUNG,
DARMSTADT (NSR)

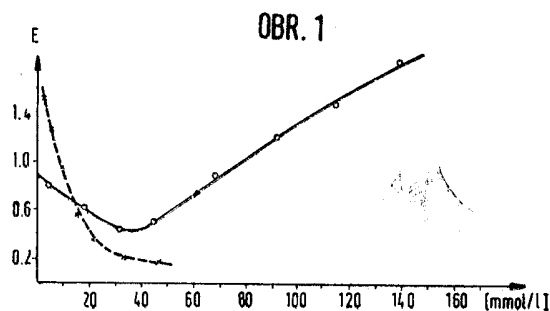
[54] Zkušební systém ke stanovení látek v tekutinách

1

Řešení se týká zkušebního systému ke stanovení látek v tekutinách obsahujícího současně alespoň dva enzymy nebo enzymové systémy pro nezávislou reakci se stanovenou látkou.

Zkušební systém s rozšířeným měřicím rozsahem je obzvláště vhodný pro stanovení glukózy.

2



Vynález se týká zkušebního systému ke stanovení látek v tekutinách, obzvláště v tělesných tekutinách.

Stanovení látek v tělesných tekutinách má pro lékařskou diagnózu velký význam. To platí jak pro kvantitativní stanovení, tak také pro semikvantitativní nebo kvalitativní způsob, který umožňuje vlastní kontrolu jednotlivým pacientům nebo jednoduchou zkoušku. Podle významu této zkoušky byly známy četné způsoby. Nejobvyklejšími způsoby jsou enzymatická stanovení, která umožňují vysoký stupeň specifičnosti. Zde se stanoví přímo nebo nepřímo vizuálně, fotometricky nebo jinými optickými nebo fyzikálně-chemickými způsoby přírůstek nebo úbytek reakční složky přítomné při reakci.

Všem těmto systémům je společné, že vždy reaguje jen enzym nebo enzymový systém se stanovovanou látkou, přičemž se reakční produkt vytvoří ve stejném nebo proporcionálním molárním poměru nebo se spotřebuje spolureagující složka.

Proto je zapotřebí pro všechny způsoby stejně velký měřicí rozsah, který se může posunovat podle citlivosti měrného signálu a zředění vzorku.

Pro lékařskou diagnózu jsou zapotřebí testy, které jsou schopné bezpečně postihnout jak jen málo rozdílné hodnoty v rozsahu normálního rozmezí a patologického rozmezí, tak také současně umožnit v patologickém rozmezí pokud možno velký rozsah. To obzvláště platí také pro třídící metody, například zkušebními tyčinkovými systémy. Měřicí rozsah získaný pro obvyklé testy je pro část získaných údajů nedostačující, to především platí pro stanovení glukózy. Bylo již sice zkoušeno tento problém vyřešit testovanými přísadami, které změní citlivost testu, větší měřicí rozsah se však získá pouze tehdy, když se pojme do celkového testu více zkoušek s příslušně různě nastavenými měřicími rozsahy.

Úkolem vynálezu je vyvinout zkušební systémy, které mají proti obvyklým systémům a způsobům několikanásobně větší měřicí rozsah při alespoň stejné přesnosti měření. Tento úkol byl vyřešen tak, že se spojí dohromady více různých enzymů nebo enzymových systémů, které reagují nezávisle na sobě se stejným substrátem jako výchozí reakční složkou, ale poskytují různé rozlišitelné konečné produkty.

Předmětem vynálezu je zkušební systém s rozšířeným měřicím rozsahem ke stanovení látek v tekutinách, který se vyznačuje tím, že obsahuje současně alespoň dva enzymy nebo enzymové systémy pro nezávislou reakci se stanovovanou látkou.

Následné spojení různých enzymatických reakcí je známo v různých příkladech, jako reakce hexokinázy a glukóza-6-fosfát-dehydrogenázy ke stanovení glukózy nebo reakce urázy a glutamátodehydrogenázy ke stanovení močoviny. Tyto enzymové systé-

my mají společné to, že jsou zapojeny za sebou, tj. že reakční produkt první reakce je výchozím substrátem druhé reakce.

Paralelní spojení různých enzymatických reakcí, tj. současná přítomnost více enzymových systémů reagujících se stejným substrátem, musí vést k souběhu obou reakcí a tím vzájemné závislosti reakcí. Při spojení reakce glukózooxidázy s reakcí glukózo-dehydrogenázy závislou na nikotinamidade-nin-dinukleotidu se získá současný průběh obou reakcí; poměr přitom vytvořených konečných produktů je závislý na koncentraci obou enzymů. Když se například zvýší koncentrace glukózooxidázy, tak se za stejných podmínek při stejné koncentraci glukózy redukuje menší množství nikotinamid-adenin-dinukleotidu.

Celkově se získá tímto způsobem sice zvětšení měřicího rozsahu, avšak zvýší se také náklady. Kromě toho registrují obě reakce společný měřicí rozsah.

Tím neočekávanější je, že je možné spojení více enzymových systémů reagujících se stejným substrátem nezávisle na sobě přímo nebo nepřímo na rozdílné produkty, přičemž se získají alespoň dva rozdílné koncentrační rozsahy stanovené látky. To znamená, že při současné přítomnosti systémů podle vynálezu reagujících s látkou probíhá reakce druhým systémem teprve po spotřebování koenzymu prvního systému. Tím se získají dva definované měřicí rozsahy v jednom celkovém rozsahu měření.

Enzym nebo systém podle vynálezu jsou dehydrogenázy s akceptory nebo donory elektronů na sobě nezávislémi. Zkušební systém podle toho obsahuje následující složky:

a) Enzym nebo enzymový systém, který reaguje s redukováným nebo oxidovaným nikotinamidenindinukleotidem (NADH, NAD⁺) nebo amidadenin-dinukleotidfosfátem kyseliny nikotinové (NADPH, NADP⁺).

b) Enzym nebo enzymový systém, který nereaguje s koenzymy uvedenými pod a), nýbrž s akceptorem nebo donorem elektronů který poskytuje měrný signál rozlišitelný od těchto koenzymů. Tyto látky jsou např. známé jako koenzymy z třídy cytochromu, chinonu nebo pyrrolochinolinchinonu, v úvahu přichází také flavinnukleotid, hexakyanoférát, methylenová modř, fenazinmetosulfát, fenazinethosulfát, benzo-chinon, dichlorfenolindofenol, dichlorindofenol, trichlorindofenol a jiné. Příslušné enzymy reagující s těmito koenzymy jsou známé z literatury.

c) Všechny koenzymy potřebné k provádění diagnostického testu pomocí enzymového systému podle vynálezu a pomocné látky jako pufr, stabilizační prostředek, chromogeny atd.

Spojením enzymů nebo enzymatických systémů uvedených pod a) a b) se získá zkušební systém podle vynálezu se dvěma definovanými měřicími rozsahy, které se dopl-

ňují na rozšířený celkový rozsah měření. V následující tabulce je uveden jako příklad výběr látek stanovitelných pomocí zkušebního systému, který může být libovolně roz-

šířen. Čísla uvedená pro enzymy závislé a nezávislé na NAD odpovídají enzymové nomenklatuře. Nomenklatur Committee of the International Union of Biochemistry:

stanovená látka	NAD-závislý enzym	NAD-nezávislý enzym
Alkohol	1.1.1.1	1.1.99.8
glukóza	1.1.1.47	1.1.99,—
glycerin-3-fosfát	1.1.1.8	1.1.99.5
glycin	1.4.1.10	1.4.2.1.
laktát	1.1.1.27	1.1.2.3
malát	1.1.1.37	1.1.99.16
mannit	1.1.1.67	1.1.2.2

V případě stanovení glukózy je NAD-závislý enzym glukózodehydrogenáza 1.1.1.47, s výhodou z *Bacillus megaterium*, a NAD-nezávislý enzym glukózodehydrogenáza 1.1.99, s výhodou z *Acinetobacter calcoaceticus*.

Pro stanovení glukózy takovými systémy, které obsahují jen jednu glukózodehydrogenázu, závislou nebo nezávislou na NAD, se získá při stejném zředění vzorků rozdílná poloha, ale při stejném rozmezí měřicího rozsahu. Systém spojený z obou enzymových systémů umožňuje naproti tomu podstatně větší měřicí rozsah. Spojení glukózodehydrogenázy a glukózooxidázy vede rovněž k rozšíření měřicího rozsahu, přitom se však získá ze současného souběhu reakcí očekávané zmenšení přesnosti měření.

glycerin-3-fosfát +

NAD + + glycerin-3-fosfátdehydrogenáza

akceptor + glycerin-3-fosfátdehydrogenáza

Enzymový systém reagující s NAD může také obsahovat tetrazoliovou sůl a systém přenášející elektrony, např. diaforázu.

Popsané enzymy reagují zpravidla se stanovovanou látkou přímo. Je však také možné spojit enzymový systém podle vynálezu s jednou nebo více předešlými enzymatickými reakcemi. Jako příklad se může uvést následující reakční systém:

lipáza

triglycerid —————> glycerin

glycerokináza

glycerin —————> glycerin-3-fosfát

NADH + dihydroxyacetonfosfát

red. akceptor + dihydroxyacetonfosfát

Tím je umožněno provádět zkušební postup s rozšířeným měřicím rozsahem pro velký počet stanovení.

Rovněž je možné pomocí zkušebního systému podle vynálezu nechat reagovat substrát, který se vytvoří reakcí stanoveného enzymu v jedné reakci. Přitom se mohou eliminovat obzvláště jednoduchým způsobem rušící vlivy, jako aditivní výsledky slepého pokusu. Např. se může odstranit při stanovení amylázy v první reakci endogenní glukóza, zatímco měřicí rozsah podmíněný druhou reakcí zůstane zcela zachován pro stanovení vytvořené glukózy.

Zkušební systém podle vynálezu nabízí také možnost změnit jeden měřicí rozsah, zatímco druhý zůstane nezměněn. Tím se může ovlivnit zkušební systém podle vynálezu tak, že existuje pro popsání limitního rozmezí normálním rozmezím a patologickým rozmezím měřicí rozsah odpovídající obvyklým metodám, zatímco se pro patologické rozmezí nastaví proměnlivý měřicí rozsah přizpůsobený požadavkům lékařské diagnózy. V případě stanovení glukózy se toto do-

sáhne přidavkem glukózooxidázy a peroxidázy.

Provedení enzymatického stanovení pomocí zkušebního systému podle vynálezu se provádí způsobem obvyklým pro enzymatické metody, přičemž se však přidávají oba enzymové systémy současně k roztoku vzorku. Vyhodnocení se může provádět vizuálně, fotometricky nebo jinými optickými, jako také fyzikálně chemickými metodami. Při fotometrickém stanovení se může vyhodnocení provádět způsobem koncového bodu při dvou určených vlnových délkách, např. při 334 a 600 nm nebo při 460 a 650 nm. Rovněž je možné kineticky registrovat a vyhodnocovat průběh reakce při jedné nebo dvou vlnových délkách.

Rozšířený měřicí rozsah přitom umožňuje především jednoduché stanovení také zvýšených patologických hodnot pro jednu látku další zředění není nutné.

Vynález bude blíže objasněn v následujících příkladech a na přiložených výkresech, kde obr. 1 představuje stanovení glu-

kózy spojeným systémem glukózodehydrogenázy s NAD jako koenzymem a glukózodehydrogenázy s dichlorfenolindofenolem jako koenzymem, obr. 2 představuje stanovení glukózy spojeným systémem glukózodehydrogenáza (NAD) za přítomnosti glukózooxidázy a peroxidázy, obr. 3 představuje grafické vizuální stanovení glukózy spojeným systémem glukózodehydrogenáza (NAD) diaforéza (tetrazoliová sůl a glukózodehydrogenáza) dichlorfenolindofenol, a obr. 4 představuje stanovení laktátu spojeným systémem laktátdehydrogenáza (NAD) diaforéza a laktátdehydrogenáza (dichlorfenolindofenol).

Na obr. 1, 2 a 4 je na úsečkách nanese-na koncentrace stanovené látky v mmol/l a na pořadnicích extinkce při dané vlnové délce. Na obrázku 3 je nanese-na na úsečce koncentrace stanovované látky v mmol/l.

Na obr. 1 znázorňuje křivka 1 stanovení glukózy měřením extinkce při 334 nm a křivka 2 stanovení glukózy měřením extinkce při 600 nm.

Na obr. 2 znázorňuje křivka 1 stanovení glukózy měřením extinkce při 334 nm.

Na obr. 3 znázorňuje přímka 1 vsázku A, přímka 2 vsázku B1, přímka 3 vsázku B2 a přímka 4 vsázku B 3.

Na obr. 4 znázorňuje křivka 1 stanovení laktátu měřením extinkce při 650 nm a křivka 2 stanovení laktátu při 460 nm.

Příklad 1

Stanovení glukózy spojeným systémem glukózodehydrogenázy s NAD jako koenzymem a glukózodehydrogenázy s dichlorfenolindofenolem jako koenzymem.

1 ml následující reakční směsi obsahující

a) 0,12 molu/l fosfátového pufru, pH 6,5

1,0 mmol/l NAD⁺

5,0 kU/l glukózodehydrogenázy z *Bacillus megaterium*

b) 0,12 molu/l fosfátového pufru, pH 6,5
0,12 mmol/l dichlorfenolindofenolu,

250 U/l glukózodehydrogenázy z *Acinetobacter/calcoaceticus*, se smíchá a přidá se 40 μ l séra (1 + 1 bez bílkoviny s 0,3 molu/l trichloroctové kyseliny) s různým definovaným obsahem glukózy. Po 15 minutách se měří extinkce při 334 a 600 nm. Získané výsledky jsou znázorněny na obr. 1.

Zatímco se s oběma jednotlivými reakcemi provede v jednom případě stanovení glukózy 0,5 až 12 mmol/l a v druhém případě 2 až 60 mmol/l, ukazuje obrázek 1, že se se spojeným systémem podle vynálezu může bezpečně stanovit 0,5 až nad 160 mmol/l glukózy. 1 mmol odpovídá 18 mg % glukózy.

Příklad 2

Stanovení glukózy spojeným systémem glukózodehydrogenáza/NAD za přítomnosti glukózooxidázy a peroxidázy.

Použijí se podmínky podle příkladu 1 a vsázka podle 1a).

Reakční směs obsahuje navíc 1 kU/l glukózooxidázy a 400 U/l peroxidázy. Získaná měřicí křivka je znázorněna v obr. 2.

Tento obr. ukazuje, že spojení reakce glukózodehydrogenázy a glukózooxidázy rovněž vede k rozšíření měřicího rozsahu, přičemž se však zmenší na základě plochého průběhu křivky přesnost měření.

Příklad 3

Vizuální stanovení glukózy spojeným systémem glukózodehydrogenáza NAD) diaforéza/tetrazoliová sůl a glukózodehydrogenáza/dichlorfenolindofenol; variace měřicího rozsahu.

Použijí se dva ml reakční směsi pro čtyři různé vsázky, které všechny obsahují 0,12 molu/l fosfátového pufru, pH 6,5 a 10⁻³ hmot. % fluoresceinu sodného. Kromě toho obsahuje vsázka A:

1 mmol/l NAD + 0,67 mmol/l 3-(4-jód-fenyl)-2-(4-nitro-fenyl)-5-fenyl-2H-tetrazoliumchloridu (INT),
5 kU/l glukózodehydrogenázy z *B. megaterium* a
250 U/l diaforázy.

vsázka B 1:

1 mmol/l NAD⁺
0,25 mmol/l dichlorfenolindofenol,
0,67 mmol/l INT
2,5 kU/l glukózodehydrogenázy z *B. megaterium*,
250 U/l glukózodehydrogenázy z *A. calcoaceticus* a
250 U/l diaforázy.

vsázka B 2:

reagencie uvedené v vsázce B1 ve stejné koncentraci včetně 500 U/l glukózooxidázy a 200 U/l peroxidázy.

vsázka B 3:

reagencie uvedené v vsázce B1 ve stejné koncentraci včetně 1 kU/l glukózooxidázy a 400 U/l peroxidázy.

K reakční směsi se připipetuje 60 μ l séra (1 + 1 bez bílkoviny s 0,3 molu/l trichloroctové kyseliny) s různým definovaným obsahem glukózy. Po 20 min. se vizuálně stanoví barevný vjem celkového roztoku, vizuálně rozlišitelné koncentrace glukózy poskytnou přitom celkový rozsah měře-

ní. Na obr. 3 je graficky znázorněn výsledek. Rozpozná se větší měřicí rozsah spojeného systému a možná široká variace.

Příklad 4

Stanovení laktátu spojeným systémem laktátdehydrogenáza (NAD) diaforáza a laktátdehydrogenáza (dichlorfenolindofenol).

Použije se 2 ml reakční směsi, která obsahuje 0,25 molu/l fosfátového pufru, pH 7,0.

1 mmol/l NAD +
0,12 mmolu/l dichlorfenolindofenolu
0,67 mmolu/l INT
5 kU/l laktátdehydrogenázy ze srdce vepře
250 U/l diaforázy a
200 U/l laktátdehydrogenázy z kvasinek.

K tomu se připipetuje 100 μ l séra (1 + 1 bez bílkoviny s 0,3 molu/l trichloroctové kyseliny). Po 30 minutách se měří extinkce při 460 a 650 nm. Získané výsledky jsou znázorněny v obr. 4.

Zatímco se stanoví s oběma jednotlivými reakcemi v jednom případě obsah laktátu 0,2 až 6 mmolu/l a ve druhém případě 0,8 až 24 mmolu/l, ukazuje obr. 4, že se spojeným systémem podle vynálezu se může stanovit 0,2 až nad 60 mmolů/l laktátu.

Příklad 5

Stanovení alkoholu se spojeným systémem nol.

alkoholdehydrogenáza (NAD) diaforáza a alkoholdehydrogenáza/dichlorfenolindofenol.

Použijí se 2 ml reakční směsi, která obsahuje 0,3 molu/l tris(hydroxymethyl)-aminomethanového pufru, pH 8,0 0,1 mmol/l NAD+,

0,12 mmolu/l dichlorfenolindofenol,
0,67 mmol/l INT,
2 kU/l ADH z kvasinek,
250 U/l diaforázy a
250 U/l ADH z *Pseudomonas* sp. M 27.

K tomu se připipetuje 50 μ l séra (1 + 1 bez bílkoviny s 0,3 molu/l trichloroctové kyseliny). Po 30 minutách se měří extinkce při 460 a 650 nm. Získá se měřicí rozsah 0,02 až nad 3 g/l alkoholu, zatímco s dvěma jednotlivými reakcemi se získají pouze měřicí rozsahy 0,02 až 0,5 nebo 0,08 až 2,2 g/l alkoholu.

Příklad 6

Stanovení glukózy v moči pomocí testovacích proužků. Savý materiál se napustí roztokem podle příkladu 2, avšak při 20násobně vyšší koncentraci enzymu, opatrně se usuší a fixuje se na vhodném nosiči. Po ponoření do roztoku vzorku se získá podle obsahu glukózy zabarvení od modré přes modrozelenou, zelenou světlezelenou, béžovou, oranžovou, červenou až tmavě červenou barvu. Vyhodnocení se může provádět srovnáním s vhodnou standardní barevnou stupnicí.

PŘEDMĚT VYNÁLEZU

1. Zkušební systém ke stanovení látek v tekutinách vyznačený tím, že obsahuje současně alespoň dva enzymy nebo enzymové systémy pro nezávislou reakci se stanovenou látkou.

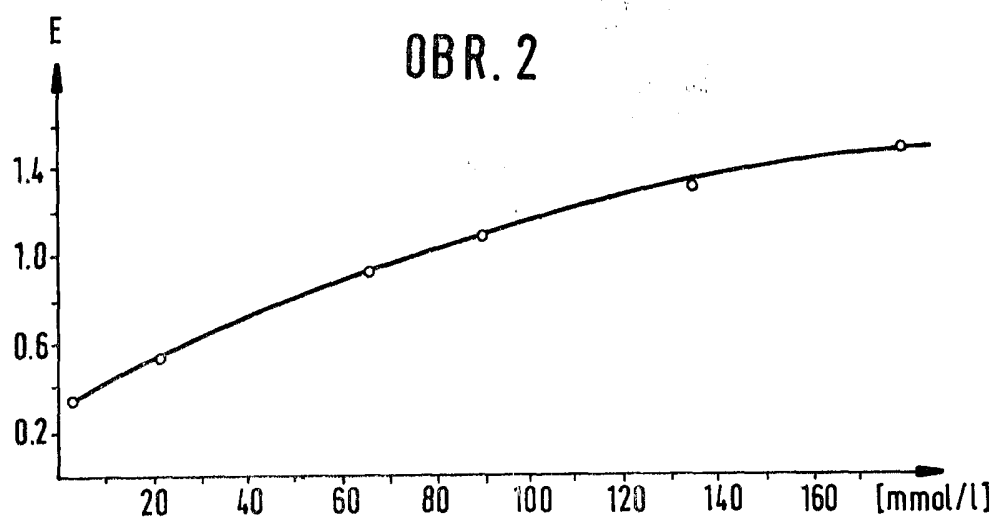
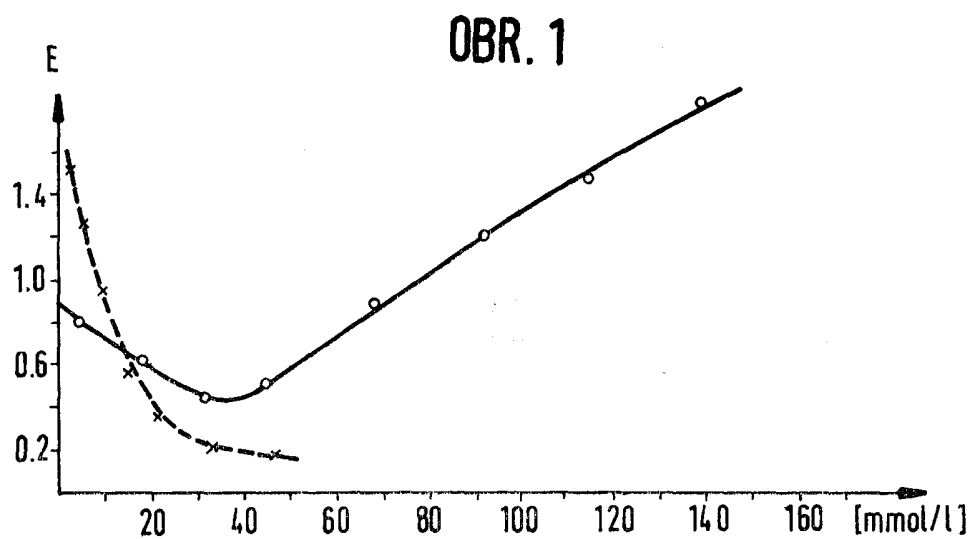
2. Zkušební systém podle bodu 1, vyznačený tím, že enzym nebo enzymové systémy jsou dehydrogenázy s alespoň dvěma rozdílnými akceptory nebo donory elektronů.

3. Zkušební systém podle bodů 1 a 2, vyznačený tím, že jeden z enzymových systémů je dehydrogenáza pro reakci s redukováním nebo oxidováním nikotinamidadeninukleotidem nebo dinikotinamidadeninukleotidfosfátem.

4. Zkušební systém podle bodů 1 až 3 ke stanovení glukózy, vyznačený tím, že enzymový systém pro reakci s nikotinamidadeninukleotidem obsahuje glukózodehydrogenázu z *Bacillus megaterium* a druhý enzymový systém pro nezávislou reakci s glukózou obsahuje glukózodehydrogenázu z *Acetobacter calcoaceticus*.

5. Zkušební systém podle bodů 1 až 4, vyznačený tím, že enzymový systém pro reakci s nikotinamidadeninukleotidem obsahuje tetrazoliovou sůl a diaforázu a/nebo fenazinmethosulfát nebo fenazinethosulfát.

6. Zkušební systém podle bodů 4 a 5, vyznačený tím, že obsahuje glukózooxidázu a peroxidázu.



OBR. 3

A

B1

B2

B3

20 40 60 80 100 120 140 160 [mmol/l]

OBR. 4

