

5/379

Osipov, A.P.; Gapanova, N.K.; Egorov, A.M.; Berezin, I.V.

(A.N. Bach-Institut für Biochemie und Moskauer M.V. Lomonosov-Universität)

## VERFAHREN ZUR BESTIMMUNG DER ALKALISCHEN PHOSPHATASE-AKTIVITÄT

Patent SU 1449588 vom 7.1.1989 (eingereicht 30.4.1987)

(Klasse C 12 Q 1/32, G 01 N 33/535)

Russ.: СПОСОБ ОПРЕДЕЛЕНИЯ АКТИВНОСТИ

ЩЕЛОЧНОЙ ФОСФАТАЗЫ

Sposob opredelenija aktivnosti ščeločnoj fosfatazy

The activity of alk. phosphatase is detd. by incubation of a sample with NADP (I) in a buffer medium with subsequent spectrophotometric recording of the hydrolysis product in an enzymic regeneration system of a cofactor-contg. alc. dehydrogenase and two substrates, one of which is EtOH. The sensitivity of the detn. is increased and a rapid and simplified detn. is ensured by incubation of the sample and recording of the hydrolysis product catalyzed by alk. phosphatase in a pH 8.5-9.1 tris-HCl buffer; by using I in reduced form at  $10^{-7}$ - $10^{-4}M$ ; by using horse liver alc. dehydrogenase at  $5 \times 10^{-7}$ - $10^{-6}M$  in the cofactor regeneration system; by using *p*-nitroso-*N,N'*-dimethylamine at  $5 \times 10^{-6}$  -  $3 \times 10^{-4}M$  as the 2nd substrate; and by adding salicylic acid amide to  $2 \times 10^{-4}$  -  $5 \times 10^{-7}M$  and Na orthophosphate to 0.05M to the system.

### Referenzen:

Self, Colin Henry: Assay method using enzymes as labelling substances.  
- European Patent Application. Europäisches Patentamt, EP 0027 036 A 1,  
15.4.1981, 59 Seiten.

Self, Colin H.: Enzyme amplification - a general method applied to  
provide an immunoassisted assay for placental alkaline phosphatase.  
In: Journal of immunological methods. Amsterdam, 76 (1985), S. 389 - 393.

Die Erfindung bezieht sich auf die Biotechnik und zwar auf die Verfahren zur Bestimmung der alkalischen Phosphatase-Aktivität und kann in der Immunoenzymanalyse, der mikrobiologischen Industrie, der analytischen Chemie u.dgl. angewandt werden. Zweck dieser Erfindung ist größere Sensibilität sowie einfachere und schnellere Bestimmung. Als Substrat wird reduziertes Nikotinamid-Adenindinukleotidphosphat benutzt, die Detektion des Hydrolyseprodukts wird in einem enzymatischen Regenerationsmedium des Kofaktors durchgeführt, das Alkoholdehydrogenase aus der Pferdeleber und zwei Substrate enthält: Äthanol und N,N'-Dimethyl-p-nitrosamin, wobei dem System Salizylsäureamid zugegeben wird. 4 Abb., 1 Tab.

Die Erfindung bezieht sich auf die Verfahren zur Bestimmung der Enzyme der alkalischen Phosphatase und kann in der Immunoenzymanalyse verschiedener biologisch aktiver Verbindungen, in der klinischen Diagnostik, in mikrobiologischen Industriezweigen, in der analytischen Chemie und dgl. angewandt werden.

Zweck dieser Erfindung ist eine größere Sensibilität sowie einfachere und schnellere Bestimmung der alkalischen Phosphatase-Aktivität.

Das Verfahren wird folgendermaßen durchgeführt:

In die Küvette des Spektrophotometers werden 0,9 ml Puffer 0,05 M tris-HCl (ph-Wert 8,5 - 9,1) mit  $10^{-5}$  M  $MgCl_2$ , 100  $\mu$ l der Prüfsubstanz, NADFN mit  $10^{-7}$  -  $10^{-4}$  M Endkonzentration gegeben und 10 - 15 min bei 30 - 37°C inkubiert. Danach werden in die Küvette 1 ml einer Lösung mit folgenden Endkonzentrationen in Mol gegeben: ADG aus der Pferdeleber  $5 \cdot 10^{-7}$  -  $10^{-5}$ , N,N'-Dimethyl-p-nitrosamin (NDMA)  $5 \cdot 10^{-6}$  -  $3 \cdot 10^{-4}$ , Ethanol 0,1 - 1, Salizylsäureamid (ASK)  $2 \cdot 10^{-4}$  -  $5 \cdot 10^{-3}$ , Natriumorthophosphat 0,05 im gleichen Puffer. Dann wird die Enzymreaktion je nach Zunahme der optischen Dichte bei 687 nm innerhalb von 1 - 3 min bestimmt. Die Kontrolle der Hintergrundreaktion im Regenerationssystem wird analog hierzu durchgeführt, dabei wird jedoch die Prüfsubstanz aus dem System weggelassen.

Aufgrund des beigemischten NADN im NADFN, aber auch der nichtfermentativen NADFN-Hydrolyse während der Inkubation ergibt sich die Hintergrundreaktion.

Der Verstärkungseffekt des Kofaktors wird in diesem Regenerationssystem aufgrund des zyklischen Prozesses Oxidation - Reduktion von NAD(N) im aktiven Enzymzentrum erreicht mit parallel dazu ablaufenden irreversiblen Reaktionen der Alkohol-Oxidation und NDMA-Reduktion. Die NDMA-Lösung ist gelb gefärbt ( $\lambda_{\text{max}} = 440 \text{ nm}$ ) und wird bei enzymatischer Reduktion farblos. Zur leichteren Beobachtung der Reaktionsgeschwindigkeit je nach Zunahme der optischen Lösungsdichte wird ins Reaktionsgemisch ASK gegeben (von Null ausgehend), das in Wechselwirkung mit dem NDMA-Reduktionsprodukt einen blauen Indalinfarbstoff bildet, der im sichtbaren Spektralbereich bei 687 nm ein Absorptionsmaximum besitzt.

Anhand der Eichkurve aus der Reaktionsgeschwindigkeit verschiedener alkalischer Phosphatase-Konzentrationen in der Lösung kann man mit hoher Empfindlichkeit den Enzymgehalt im Prüfstoff bestimmen.

Das vorgeschlagene System der Kofaktorregenerierung ist im Vergleich mit dem bislang bekannten einfacher, weil es nur ein einziges Enzym umfaßt und man dadurch NAD(N) in geringen Konzentrationen und in kürzeren Zeitabschnitten bestimmen kann. Die Wahl von Pferdeleber-ADG als Regenerationssystem ist dadurch bedingt, daß es einen zyklischen Oxidations-Reduktionsprozeß des Kofaktors im Beisein von zwei gekoppelten Substraten bewirken kann, im Unterschied zu Hefe-ADG, welches im bekannten Verfahren benutzt wird und das nur an der Reduktion von NAD und NADN beteiligt ist, wobei man für die Regeneration von NAD aus NADN ins System ein zweites Diaphorase-Enzym einbringen muß.

Die Wahl des ADG-Konzentrationsbereichs ist bedingt durch die proportional zunehmende Reaktionsgeschwindigkeit bei anstrengender ADG-Konzentration in der Lösung. Bei einem ADG-Gehalt über  $10^{-5} \text{ M}$  im System stellt man einen stärkeren Reaktionshintergrund aufgrund des beigemischten endogenen NAD, des im Präparat enthaltenen Enzyms fest. Auch treten wegen der hohen Reaktionsgeschwindigkeiten Schwierigkeiten beim Nachweis auf.

Die Konzentrationsbereiche der gekoppelten Substrate NDMA und Ethanol wurden unter Berücksichtigung der Fermentsättigung im Substrat ( $> K_m$ ) und der Enzymreaktionsgeschwindigkeitskonstanz gewählt.

Verwendet man Substrate in Konzentrationen unter den genannten Grenzwerten, führt dies zu einer proportionellen Geschwindigkeitszunahme, darüber zu einem unproduktiven Verbrauch an Reaktionsmitteln. ASK wird in hohem Überschuß ins System gegeben, um eine schnellstmögliche Wechselwirkung mit dem NDMA-Reduktionsprodukt zu erreichen. Die Obergrenze 5 mM ist dadurch bedingt, daß die zu beobachtende Reaktionsgeschwindigkeit bei weiter zunehmender ASK-Konzentration im Reaktionsgemisch keinen Einfluß besitzt.

Als Puffersubstanz im Regenerationssystem empfiehlt sich tris-HCl mit dem gleichen pH-Wert wie im Inkubationsstadium der alkalischen Phosphatase mit dem NADFN-Substrat. Die festgestellte Enzymreaktionsgeschwindigkeit im Regenerationssystem nimmt mit höherem pH-Wert im Gemisch im Bereich 7,2 - 9,1 stark zu. Ein weiter zunehmender pH-Wert hat auf die Geschwindigkeitsveränderung praktisch keinen Einfluß. Zur Annäherung der pH-Optima der alkalischen Phosphatase- und der ADG-Aktivität im System wurde der pH-Wert im Bereich 8,5 - 9,1 gewählt, dessen Obergrenze durch die Puffereigenschaften von tris-HCl limitiert wird. Die Benutzung von tris-HCl als Puffersubstanz im Regenerationssystem ist dadurch bedingt, daß es ein guter Fänger für Acetaldehyd, ein Hemmstoff für das Enzym, ist, der sich bei Alkoholoxidation bildet. Das Tris-Molekül (3-Oxymethylaminomethan) enthält in seiner Zusammensetzung eine freie Aminogruppe, die das Aldehyd wirkungsvoll binden kann (mit Bildung von Azomethin).

Zur Desaktivierung der alkalischen Phosphatase, um in einem sekundären Einenzymregenerationssystem die Reaktion mit konstanter Geschwindigkeit durchführen zu können (Einheit opt.Dichte/min), wird der alkalische Phosphatase-Hemmstoff Natriumorthophosphat in 0,05 M Endkonzentration ins System gegeben.

Die Verwendung der reduzierten NADFN-Form hängt im Vergleich zu NADF mit ihrer höheren Sensibilität im alkalischen Bereich zusammen. Der NADFN-Gehalt in der Lösung schwankt zwischen  $10^{-7}$  -  $10^{-4}$  M. Die Obergrenze ist dadurch bedingt, daß die Enzym-Reaktionsgeschwindigkeit nicht von der NADFN-Konzentration abhängt und auch eine Steigerung der Hintergrund-

Reaktionsgeschwindigkeit möglich ist. Die Untergrenze wiederum ist dadurch bedingt, daß die Enzymgeschwindigkeit abnimmt und infolgedessen die Bestimmungsempfindlichkeit der alkalischen Phosphatase sinkt.

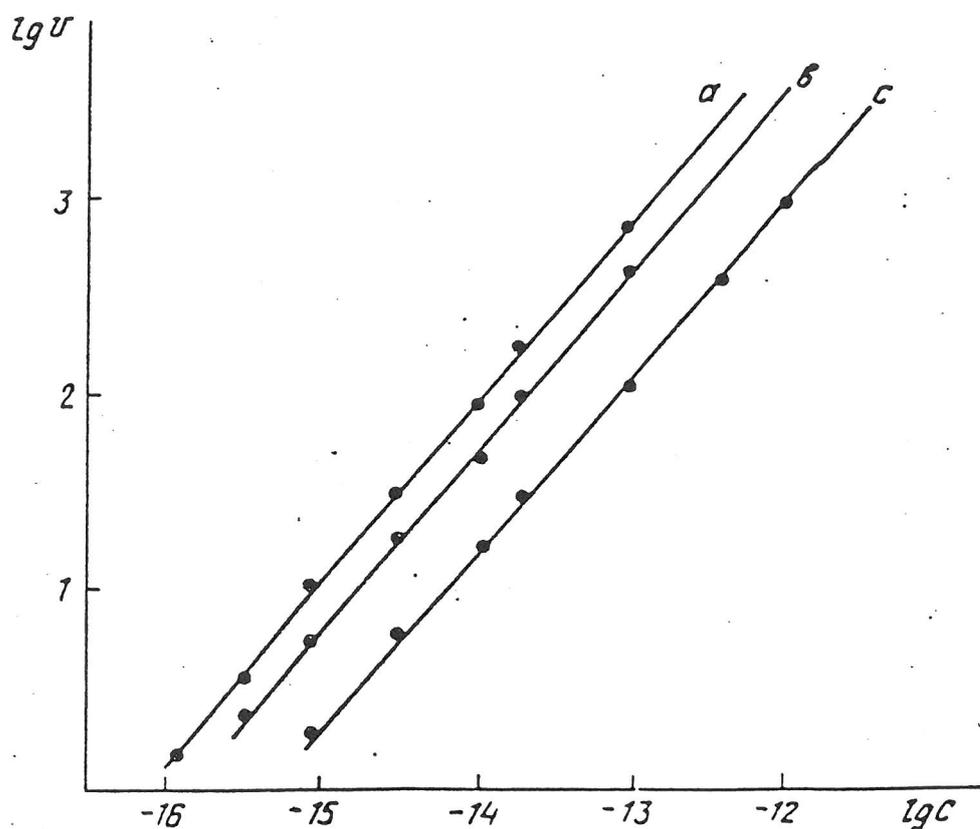


Abb. 1

In den Abb. 1 - 4 sind die Abhängigkeiten der ermittelten Geschwindigkeit (Einheit opt.Dichte  $\times 10^2 \text{ min}^{-1}$ ) der NDMA-Enzymreaktion im Regenerations-system des Kofaktors von der Konzentration  $C(\text{M})$  der alkalischen Phosphatase in einer Lösung in Logarithmen-Koordinaten bei verschiedenen pH-Werten der Puffersubstanz dargestellt:

Abb. 1: pH-Wert 9,1 (a), 8,5 (b), 8,0 (c), sowie bei verschiedenen Konzentrationen im NADFN-System:

Abb. 2:  $10^{-5} \text{ M}$  (a),  $4 \cdot 10^{-6} \text{ M}$  (b),  $5 \cdot 10^{-7} \text{ M}$  (c), und im ADG-System:

Abb. 3:  $10^{-4} \text{ M}$  (a),  $2,5 \cdot 10^{-9} \text{ M}$  (b),  $5 \cdot 10^{-6} \text{ M}$  (c).

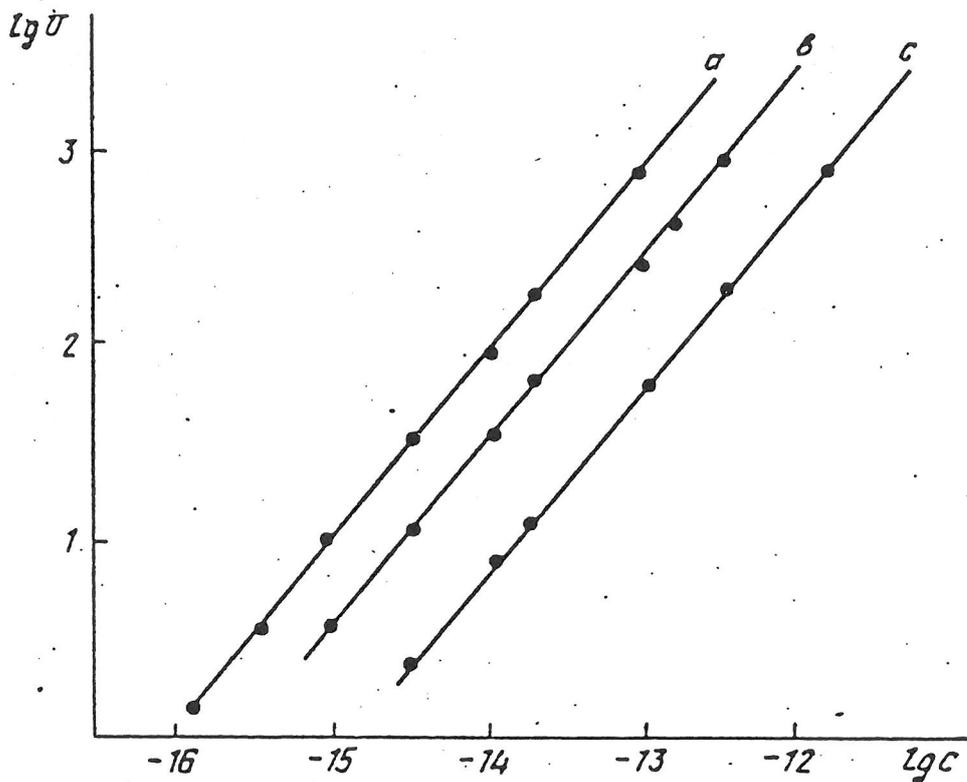


Abb. 2

1. Beispiel. Bestimmung der alkalischen Phosphatase-Aktivität in einer Lösung bei Konzentrationen von  $10^{-16}$  -  $10^{-13}$  M unter Verwendung eines Einenzym-Regenerationssystems des Kofaktors.

Hergestellt werden Lösungen 0,05 tris-HCl Puffersubstanz (pH-Wert 9,1) mit der Zusammensetzung:  $\text{MgCl}_2$   $10^{-3}$  M; NADFN in der Konzentration  $5 \cdot 10^{-4}$  M;  $\text{Na}_3\text{PO}_4$  1 M; ADG  $10^{-3}$  M im gleichen Puffer; Ethanol-Lösungen NDMA 4 - 4,5 mg/ml; ASK 20 mg/ml; Standardlösungen der alkalischen Phosphatase mit der spezifischen Aktivität 1000 U/min·mg Protein bei Konzentrationen von  $10^{-15}$  -  $10^{-11}$  M in Wasser oder tris-HCl Puffer (pH-Wert 8,0).

In einem separaten Gefäß wird das Substratgemisch zubereitet mit (in ml): Puffersubstanz 8,5; NDMA-Lösung 0,1; ASK-Lösung 0,2;  $\text{Na}_3\text{PO}_4$ -Lösung 1; ADG-Lösung 0,2, mit einem Gesamtvolumen von 10 ml (für 10 Analysen). In die Küvette des Spektrophotometers werden 0,7 ml tris-HCl Puffer, 100  $\mu\text{l}$

alkalische Phosphatase-Standardlösung und 200  $\mu$ l NADFN-Lösung gegeben. Das Gemisch wird in der Küvette 15 min lang bei 30°C inkubiert. Danach wird 1 ml Substratgemisch in die Küvette gegeben und die Zunahme der optischen Dichte in einem bestimmten Zeitraum (1 min) bei  $\lambda_{\max} = 687 \text{ nm}$  bestimmt, was der Enzymreaktionsgeschwindigkeit entspricht (V; Einheit opt. Dichte/min).

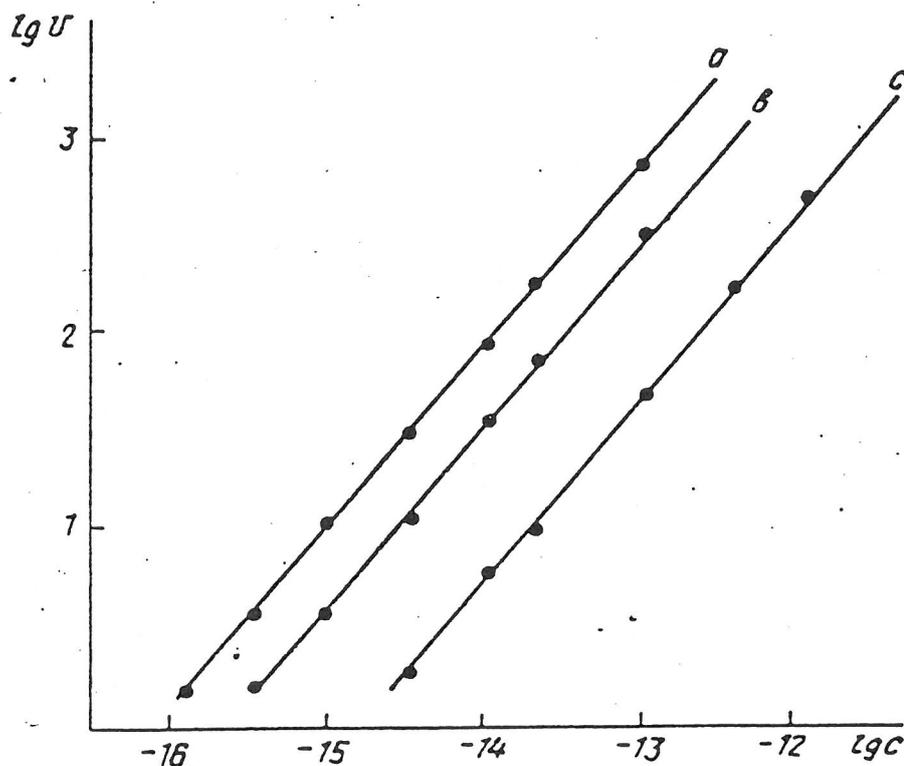


Abb. 3

Die ermittelte Abhängigkeit der festgestellten NDMA-Enzymreduktionsgeschwindigkeit im Regenerationssystem von der alkalischen Phosphatase-Konzentration in der inkubierten Lösung ist in Logarithmen-Koordinaten in Abb. 1a) dargestellt. Man erkennt, daß die Reaktionsgeschwindigkeit im System mit zunehmender alkalischer Phosphatase-Konzentration im Bereich  $10^{-16} - 10^{-13} \text{ M}$  proportional ansteigt. Weil man die sehr großen Reaktionsgeschwindigkeiten im System im Bereich hoher alkalischer Phosphatase-Konzentrationen technisch schwer messen kann, wird die Aktivitätsbestimmung bei geringeren Konzentrationen der Reagenten im System (NADFN, ADG, NDMA

usw.) oder bei niedrigerem pH-Wert des Reaktionsgemisches durchgeführt, was die Reaktionsenzymgeschwindigkeit mindert.

2. Beispiel. Bestimmung der alkalischen Phosphatase-Aktivität in einer Lösung im Konzentrationsbereich  $10^{-15}$  -  $10^{-12}$  M unter Verwendung eines Einenzym-Regenerationssystems des Kofaktors.

A. Hergestellt wird eine Lösung 0,05 M tris-HCl Puffersubstanz (pH-Wert 8,0). Die Lösungen der Reagenten werden aus den gleichen Substanzen und mit denselben Konzentrationen wie im 1. Beispiel angefertigt, nur der pH-Wert des benutzten tris-HCl Puffers ist 8,0 und die NDMA-Endkonzentration im Reaktionsgemisch  $5 \cdot 10^{-6}$  M. Die alkalische Phosphatase-Aktivitätsbestimmung wird wie im 1. Beispiel durchgeführt. Nach den ermittelten Werten wird eine Eichkurve über die Abhängigkeit der Enzymreaktionsgeschwindigkeiten im System von der alkalischen Phosphatase-Konzentration in Logarithmen-Koordinaten konstruiert (Abb. 1, Kurve c).

B. Alle Reagenslösungen und das Substratgemisch werden wie im 1. Beispiel unter Verwendung von 0,05 M tris-HCl (pH-Wert 9,1) zubereitet. In die Küvette des Spektrophotometers werden 0,9 ml Puffer, 0,1 ml Standardprüfsubstanz und 10  $\mu$ l NADFN-Ausgangslösung mit einer Endkonzentration in der Küvette von  $5 \cdot 10^{-6}$  M gegeben. Dann wird die Analyse wie im 1. Beispiel fortgesetzt, wobei die ASK-Endkonzentration im System  $2 \cdot 10^{-4}$  M beträgt. Die Eichkurve (c) ist in Abb. 2 dargestellt.

C. Die Pufferlösung und die Reagenslösungen werden wie im 1. Beispiel zubereitet. Das Substratgemisch wird ebenfalls wie im 1. Beispiel hergestellt, es werden jedoch 10  $\mu$ l ADG-Ausgangslösung mit  $6 \cdot 10^{-7}$  M Endkonzentration im System und dementsprechend 8,7 ml Puffersubstanz genommen. Die Analyse erfolgt wie im 1. Beispiel. Die Eichkurve (c) für die Abhängigkeit der Enzymreaktionsgeschwindigkeit im System von der alkalischen Phosphatase-Konzentration ist in Abb. 3 dargestellt.

Die Reaktionsenzymgeschwindigkeit im Regenerationssystem des Kofaktors steigt somit linear mit zunehmender alkalischer Phosphatase-Konzentration. Weicht man von den optimalen Bestimmungsbedingungen der alkalischen Phosphatase in der Lösung ab (Beispiele A - C), verschiebt sich der Bereich der gemessenen Lösungskonzentration zugunsten höherer Werte um fast eine ganze Größenordnung.

3. Beispiel. Bestimmung der alkalischen Phosphatase-Aktivität im untersuchten Prüfstoff unter Verwendung eines Einenzym-Regenerationssystems des Kofaktors.

Zubereitet werden die Lösungen der Puffersubstanz, der Reagenten und des Substratgemisches wie im 1. Beispiel. Ebenfalls wie im 1. Beispiel wird die alkalische Phosphatase-Aktivität im Prüfstoff bestimmt, wobei  $100 \mu\text{l}$  Prüfsubstanz für jede Messung anstelle der Enzym-Standardlösung genommen werden. Die ermittelten Reaktionsgeschwindigkeitswerte werden in die Eichkurve eingetragen (Abb. 1, Kurve a). Um die unbekannte alkalische Phosphatase-Konzentration im untersuchten Prüfstoff exakter feststellen zu können, wird eine Eichkurve für die Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit von der alkalischen Phosphatase-Konzentration in der Lösung in üblichen Koordinaten erstellt (V, Einheit opt.Dichte/min; C, M). Dabei wird ein wesentlich kleinerer Bereich der alkalischen Phosphatase-Konzentrationen von  $10^{-15}$  -  $10^{-13}$  M in der Lösung gewählt (Abb. 4).



Abb. 4

Die ermittelten Werte der Enzymkonzentrationen in dem bestimmten Prüfstoff sind nach der Eichkurve in der Tabelle angegeben. Die Schwankung der Werte beträgt 7,5 %.

Experim. Geschwindigkeit V, Einheit opt. Dichte/min	Bestimmte Werte $X_i$ , $M \cdot 10^{-14}$	Mittelwerte, $\bar{x}$ , $M \cdot 10^{-14}$	Streuung, $S^2 \cdot 10^{28}$	Ausgewählte Standardabweichung, $S \cdot 10^{14}$
2,6	1,90			
2,8	2,05		0,04	0,19
2,45	1,79	2,54		
2,55	1,86			
2,3	1,75			

Die Schwankungszahl  $K_S = \frac{S}{\bar{x}} \times 100 \% = 7,5 \%$ .

Das vorgeschlagene Verfahren zur Bestimmung der alkalischen Phosphatase-Aktivität zeichnet sich durch eine höhere Sensibilität (bis  $10^{-16}$  M) im Vergleich zu den bekannten Verfahren (bis  $10^{-15}$  M) und durch Kostensenkung aus (anstelle von zwei Enzymen im Bestimmungssystem wird nur das eine Enzym ADG benutzt). Für die Durchführung des Verfahrens wird nur wenig Zeit benötigt (15 - 20 min gegenüber bis zu 3 Std. beim herkömmlichen Verfahren).

Dieses Verfahren kann große Anwendung finden in der Festphasen-Immunoenzym-Analyse von Antigenen und Antikörpern bei Verwendung von alkalischer Phosphatase als Markierung.

#### Patentanspruch

Das Verfahren zur Bestimmung der alkalischen Phosphatase-Aktivität, das eine Inkubation des Prüfstoffes mit dem Substrat Nikotinamid-Adenindinukleotidphosphat (NADF) in einer Puffersubstanz mit darauffolgender

spektrophotometrischer Aufzeichnung des Hydrolyseprodukts im Enzym-Regenerationssystem des Kofaktors, welches Alkoholdehydrogenase (ADG) und zwei Substrate enthält, von denen eines Ethanol ist, zeichnet sich dadurch aus, daß für eine größere Sensibilität sowie für ein einfacheres und schnelleres Bestimmungsverfahren die Inkubation der Prüfsubstanz und die Aufzeichnung des durch die alkalische Phosphatase katalysierten Hydrolyseprodukts in dem Puffer tris-HCl (pH-Wert 8,5 - 9,1) vollzogen und NADF in reduzierter Form in einer Konzentration von  $10^{-7}$  -  $10^{-4}$  M, im Regenerationssystem des Kofaktors ADG aus der Pferdeleber in  $5 \cdot 10^{-7}$  -  $10^{-5}$  M Konzentration und als sekundäres Substrat N,N'-Dimethyl-p-nitrosamin in  $5 \cdot 10^{-6}$  -  $3 \cdot 10^{-4}$  M Konzentration benutzt wird, wobei in das System Salizylsäureamid in  $2 \cdot 10^{-4}$  -  $5 \cdot 10^{-3}$  M Konzentration und Natrium-Orthophosphat bis zu einer Konzentration von 0,05 M gegeben wird.

---

Stuttgart, den 13. Juni 1991

übersetzt von



(Ottmar Pertschi)  
Diplom-Übersetzer