J. Clin. Chem. Clin. Biochem.
Vol. 23, 1985, pp. 453–460

Peroxidase aus Meerrettich: Kinetische Studien und Optimierung der Peroxidase-Aktivitätsbestimmung mit den Substraten H_2O_2 und 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin

Von H. Gallati und I. Pracht

Zentrale Forschungseinheiten F. Hoffmann-La Roche & Co. AG Basel (Schweiz)

(Eingegangen am 14. Januar/29. April 1985)

Zusammenfassung: Peroxidase aus Meerrettich wird oft als Markierungs- und Indikatorenzym bei Enzymimmunoassays eingesetzt. Zur Optimierung der Peroxidase-Aktivitätsbestimmung wird die Kinetik der katalytischen Reaktion in Abhängigkeit der H_2O_2 - und der 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin-Konzentration bei verschiedenen pH-Werten, Reaktionstemperaturen und Inkubationszeiten untersucht. Auf Grund dieser Ergebnisse wird ein Testverfahren vorgeschlagen, das erlaubt, die Peroxidase in einem Meßbereich von 0–200 ng/l mit einer Nachweisgrenze von 10 ng/l quantitativ zu bestimmen. Zusätzlich werden Meßmethoden zur Bestimmung von 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin und H_2O_2 beschrieben.

Horseradish peroxidase:

Kinetic studies and optimization of the peroxidase activity determination with the substrates H_2O_2 and 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine

Summary: Horseradish peroxidase is often used as a labelling and indicator enzyme in enzyme immunoassays. In order to optimize the peroxidase activity determination, the kinetics of the catalytic reaction were investigated in relation to the concentration of H_2O_2 and 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine, at different pH values, reaction temperatures and incubation times. On the basis of the results, a test procedure is presented, which enables the quantitative determination of peroxidase in the range 0–200 ng/l. In addition, methods are described for the determination of 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine and H_2O_2 .

Einführung

Peroxidase aus Meerrettich (Donor: hydrogen peroxide oxidoreductase, EC 1.11.1.7) wird häufig bei Enzymimmunoassays als Markierungs- und Indikatorenzym verwendet.

Zur Bestimmung der Peroxidase steht mit *o*-Phenylendiamin ein hochempfindlicher Redoxindikator zur Verfügung. Allerdings besitzt dieses Substrat eine ausgeprägte mutagene und kanzerogene Aktivität.

Mit 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin wurde ein Redoxindikator synthetisiert (1), der keine oder nur sehr geringe mutagene und kanzerogene Aktivität zeigt (1,

2). Es konnte nachgewiesen werden, daß die Kanzerogenität des Benzidins erst durch die Hydroxylierung in *ortho*-Stellung des Moleküls entsteht. Durch die Methylierung des Benzidins ist die Bildung des 3,3'-Dihydroxybenzidins im Organismus nicht mehr möglich, so daß es seine mutagene und kanzerogene Aktivität verliert.

3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin wurde bis jetzt vor allem für die Bluttests, den Hämoglobinnachweis im Serum und im Urin verwendet, um das stark kanzerogene Benzidin zu ersetzen (3, 4). 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin eignet sich aber auch für die Bestimmung der Peroxidase (5).

In der vorliegenden Arbeit wird zur Optimierung der Peroxidase-Aktivitätsbestimmung die Kinetik der katalytischen Reaktion in Abhängigkeit der H_2O_2 - und der 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin-Konzentration bei unterschiedlichen pH-Werten, Reaktionstemperaturen und Inkubationszeiten untersucht. Als Ergebnis kann ein einfaches Testverfahren vorgeschlagen werden, das erlaubt, die Peroxidase bei einem Meßbereich von 0–200 ng/l mit einer Nachweisgrenze von 10 ng/l quantitativ zu bestimmen.

Zusätzlich wurde die Möglichkeit zum sofortigen und vollständigen Abstoppen der peroxidatischen Aktivität sowie zur Stabilisierung der entstandenen Farbintensität untersucht. Es werden auch Testmethoden zur Bestimmung der 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin- und der H_2O_2 -Konzentration beschrieben.

Material und Methoden

Reagenzien

Peroxidase aus Meerrettich (Donor: hydrogen-peroxide oxidoreductase, EC 1.11.1.7) wurde in lyophilisierter Form von der Firma Boehringer Mannheim (Best. Nr. 108090) bezogen. Das Enzympräparat, dessen Reinheitszahl mit „ca 3,0“ (Extinktion 403 nm/Extinktion 275 nm) angegeben wird, wurde ohne weitere Reinigung eingesetzt.

3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin wurde von der Firma Fluka Schweiz (Best. Nr. 87748) und H_2O_2 in einer 300 g/kg-Lösung von der Firma Merck (Best. Nr. 822287) geliefert.

Die übrigen Chemikalien waren von analytischer Reinheit.

Testlösungen

H_2O_2 -Pufferlösung: Die H_2O_2 -Pufferlösung enthält 0,21 mol/l Kaliumcitrat vom pH 3,95 ($\pm 0,05$) und 3,15 mmol/l H_2O_2 . Diese Lösung ist, bei 15–25 °C aufbewahrt, einige Wochen haltbar.

3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin: 252 mg 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin ($M_r = 240,35$) werden in 5,0 ml Aceton gelöst und anschließend 45 ml Methanol zugegeben. Diese 21 mmol/l 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin-Lösung ist lichtgeschützt bei 15–25 °C aufbewahrt einige Wochen haltbar.

Aktivitätsbestimmung der Peroxidase

Zur Herstellung der gebrauchsfertigen Substratlösung wird zu 20 Volumenteilen H_2O_2 -Pufferlösung 1 Volumenteil 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin-Lösung zugemischt. Diese Lösung ist bei 15–25 °C etwa 2–3 Stunden haltbar.

Für die Aktivitätsbestimmung der Peroxidase werden in einer Photometer-Meßküvette von 10 mm Schichtdicke zu 1,0 ml gebrauchsfertiger Substratlösung (0,2 mol/l Kaliumcitrat vom pH 3,95 mit 3 mmol/l H_2O_2 und 1 mmol/l 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin) 0,1 ml Peroxidaselösung (Endkonzentration in der Testlösung bis 200 µg/l Peroxidase) zugemischt und bei 22 °C die Absorptionzunahme während 30 Minuten bei der Wellenlänge 370 nm photometrisch gemessen. Abweichungen von diesem Testvorgehen werden bei den einzelnen Versuchen speziell erwähnt.

Resultate und Diskussion

Struktur, Reaktionsmechanismus und Spektren des 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidins

In Anlehnung an die Arbeit von P. D. Josephy et al. (6) über die Oxidation des 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidins kann angenommen werden, daß auch unter der katalytischen Einwirkung der Peroxidase das farblose 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (I) in einem ersten Schritt zum blaugefärbten Radikalkation (II) und dieses in einem zweiten Schritt zum gelbgefärbten 3,3',5,5'-Tetramethyl-1,1'-diphenochinon-4,4'-diimoniumsalz (III) oxidiert wird.

I. 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin, farblos, $\lambda_{\text{max}} = 210 \text{ nm}, 286 \text{ nm}$

II. 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin-Radikalkation, blaugefärbt, $\lambda_{\text{max}} = 210 \text{ nm}, 370 \text{ nm}, 650 \text{ nm}$

III. 3,3',5,5'-Tetramethyl-1,1'-diphenochinon-4,4'-diimoniumion, gelbgefärbt, $\lambda_{\text{max}} = 210 \text{ nm}, 450 \text{ nm}$

In Abbildung 1 ist das Spektrum des 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidins (I) mit den zwei ausgeprägten Absorptionsmaxima bei den Wellenlängen 210 nm und 286 nm aufgezeichnet. Während dem ersten Oxidationsschritt verschwindet die Absorbance bei der Wellenlänge 286 nm, während jene bei 210 nm erhalten bleibt. Die Konzentration an 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (I) kann demnach mit einer einfachen Absorptionsmessung bei der Wellenlänge 286 nm bestimmt werden: In einer Quarzküvette von 10 mm Schichtdicke wird vom 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (0–50 µmol/l), das in bidestilliertem Wasser gelöst ist, die Absorbance bei der Wellenlänge 286 nm gemessen. An Hand einer mitgeführten Standardkurve kann direkt die 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin-Konzentration in der Probe abgelesen werden.

Abb. 1. Absorptionsspektrum des 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidins (I).
Von 30 $\mu\text{mol/l}$ 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin in destilliertem Wasser wurde das Spektrum im Wellenlängenbereich von 200 nm–400 nm aufgenommen.

Abbildung 2 zeigt die Absorptionsspektren, wie sie während der 30-minütigen enzymatischen Oxidation des 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidins jeweils nach bestimmten Zeitintervallen aufgenommen wurden. Unter den gegebenen Reaktionsbedingungen (geringe Peroxidase menge, großer Überschuß an 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin und H_2O_2) wird nur das blaugefärbte Radikalkation (II) mit den Absorptionsmaxima bei den Wellenlängen 370 nm und 650 nm gebildet. Auf Grund dieser Resultate kann für die kinetische Aktivitätsbestimmung der Peroxidase die photometrische Messung sowohl bei 640–650–660 nm wie auch bei 370 nm durchgeführt werden. Die Absorbanz des Radikalkations (II) bei der Wellenlänge 370 nm ist um 60% höher als bei der Wellenlänge 650 nm.

Mit einer drastischen Erhöhung der Peroxidase menge und/oder einer entsprechenden Verminderung der 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin-Konzentration in der Testlösung kann neben dem blaugefärbten Radikalkation (II) mehr und mehr auch das gelbgefärbte 3,3',5,5'-Tetramethyl-1,1'-diphenochinon-4,4'-diimo-

Abb. 2. Absorptionsspektrum des 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidins während der enzymatischen Oxidation.
200 μg Peroxidase werden in 1,0 ml Substratpuffer (0,2 mol/l Kaliumcitrat von pH 3,95 mit 3 mmol/l H_2O_2 und 1,0 mmol/l 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin) bei 22 °C inkubiert und während der Reaktionsdauer von 30 Minuten jeweils nach je 5 Minuten ein Absorptionsspektrum im Wellenlängenbereich von 350 nm–800 nm aufgenommen.

niumion (III) gebildet werden. In Abbildung 3 sind die Absorptionsspektren dargestellt, wie sie mit unterschiedlichen Peroxidase mengen in der Testlösung (0,03–20 mg/l) bei Anwesenheit von 15 $\mu\text{mol/l}$ 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin erhalten wurden. Diese Resultate zeigen, daß mit steigender Peroxidasekonzentration die Absorption bei den Wellenlängen 370 nm und 650 nm abnimmt, während sich gleichzeitig ein neues Absorptionsmaximum bei der Wellenlänge 450 nm bildet. Die Abbildung 4 zeigt an Hand der Absorptionsspektren die zeitabhängige, enzymatische Oxidation des 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidins (I) über das Radikalkation (II) zum 3,3',5,5'-Tetramethyl-1,1'-diphenochinon-4,4'-diimoniumion (III) bei Anwesenheit von 15 $\mu\text{mol/l}$ 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin und 4 mg/l Peroxidase in der Testlösung.

Abb. 3. Absorptionsspektren des 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidins, das unter Einwirkung verschiedener Mengen Peroxidase oxidiert wurde. 15 $\mu\text{mol/l}$ 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin in 0,2 mol/l Kaliumcitratpuffer vom pH 3,95 wurde mit 3 mmol/l H_2O_2 in Anwesenheit von unterschiedlichen Peroxidasekonzentrationen (0,03–20 mg/l) während einer 30-minütigen Reaktionsdauer bei 22 °C zur Umsetzung gebracht und anschließend die Absorptionsspektren der einzelnen Testlösungen im Wellenlängenbereich von 350 nm–700 nm aufgenommen.

Abb. 4. Absorptionsspektren des 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidins während der enzymatischen Oxidation bei Anwesenheit von 4 mg/l Peroxidase in der Testlösung. 15 $\mu\text{mol/l}$ 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin in 0,2 mol/l Kaliumcitratpuffer vom pH 3,95 wurde mit 3,0 mmol/l H_2O_2 in Anwesenheit von 4,0 mg/l Peroxidase bei 22 °C zur Umsetzung gebracht, wobei während der 30-minütigen Reaktionsdauer nach der 5., der 20. und der 30. Minute je ein Absorptionsspektrum im Wellenlängenbereich von 350 nm–700 nm aufgenommen wurde.

Auf Grund dieser Verhältnisse kann die Konzentration an 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (I) auch enzymatisch bestimmt werden: In einer Photometerküvette von 10 mm Schichtdicke werden 0–20 $\mu\text{mol/l}$ 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin in 0,2 mol/l Kaliumcitratpuffer von pH 3,95 bei Anwesenheit von 3,0 mmol/l H_2O_2 durch Zusatz von 20 mg/l Peroxidase katalytisch zum 3,3',5,5'-Tetramethyl-1,1'-diphenochinon-4,4'-diimoniumion oxidiert und die Absorbanz bei der Wellenlänge 450 nm gemessen. An Hand einer mitgeführten Standardkurve kann direkt die 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin-Konzentration in der Probe abgelesen werden.

Das oxidierte, blaufärbte 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin-Radikalkation (II) kann auch durch die Senkung des pH-Wertes zum gelben 3,3',5,5'-Tetramethyl-1,1'-diphenochinon-4,4'-diimoniumion (III)

überführt werden. Wie die Absorptionsspektren der Abbildung 5 zeigen, ist dabei der Anteil an 3,3',5,5'-Tetramethyl-1,1'-diphenochinon-4,4'-diimoniumion (III) zum Radikalkation (II) von der Wasserstoffionenkonzentration abhängig. Eine vollständige Umsetzung zum 3,3',5,5'-Tetramethyl-1,1'-diphenochinon-4,4'-diimoniumion und damit zusammenhängend die Ausbildung eines einzigen Absorptionsmaximums bei der Wellenlänge 450 nm wird bei einem pH-Wert von 1,0 und tiefer erreicht. Dies ist vor allem bei der Durchführung von enzym-immunologischen Tests, bei denen die Peroxidase als Indikatorenzym eingesetzt wird, von großem Vorteil. Durch die Absenkung des pH-Wertes in der Testlösung kann zugleich die peroxidatische Aktivität sofort und vollständig gestoppt, die Farbintensität gesteigert und stabilisiert sowie eine Farbe erreicht werden, für deren photometrische Messung das gebräuchliche Filter von 450 nm benützt werden kann.

Abb. 5. Absorptionsspektren des oxidierten 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidins bei verschiedenen pH-Werten. Nach einer 30-minütigen katalytischen Einwirkung von 150 ng/l Peroxidase auf 1,0 mmol/l 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin in Anwesenheit von 3 mmol/l H_2O_2 in 0,2 mol/l Kaliumcitratpuffer vom pH 3,95 wurde durch Zugabe von konzentrierter Schwefelsäure der pH-Wert der Testlösung entsprechend abgesenkt auf pH 3,0 (—), auf pH 2,0 (·····), pH 1,5 (— — —) und dann auf pH 1,0 und 0,5 (—). Von diesen Lösungen sind die Absorptionsspektren im Wellenlängenbereich von 350 nm – 700 nm aufgenommen.

Peroxidaseaktivität in Abhängigkeit der 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin-Konzentration

Die Abhängigkeit der Peroxidaseaktivität von der 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin-Konzentration ist in der Abbildung 6 nach der Darstellungsweise von *Lineweaver-Burk* aufgezeichnet. Daraus kann direkt die 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin-Affinität der Peroxidase als *Michaelis*-Konstante ($K_m = 0,31$ mmol/l) sowie die maximal mögliche Reaktionsgeschwindigkeit abgelesen werden. Auf Grund der beschränkten Löslichkeit im Substratpuffer sollte allerdings die 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin-Konzentration von 1 mmol/l nicht überschritten werden. Die 3,3',5,5'-Tetra-

Abb. 6. *Michaelis*-Konstante der Peroxidase für 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin.

200 ng/l Peroxidase wurde während 30 Minuten bei 22 °C in 0,2 mol/l Kaliumcitratpuffer vom pH 3,95 mit 3 mmol/l H_2O_2 und den entsprechenden 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin-Konzentrationen inkubiert und anschließend die Absorbanz bei der Wellenlänge 370 nm photometrisch gemessen. Darstellung der Resultate nach *Lineweaver-Burk*.

methylbenzidin-Affinität der Peroxidase ist im untersuchten pH-Bereich von 3,5–6,0 unabhängig vom pH-Wert der Testlösung.

Peroxidaseaktivität in Abhängigkeit der H_2O_2 -Konzentration

Die Abhängigkeit der Peroxidaseaktivität von der H_2O_2 -Konzentration wird sehr stark beeinflusst vom pH-Wert der Testlösung, von der Reaktionsdauer der peroxidatischen Oxidation sowie von der 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin-Konzentration.

In Abbildung 7 sind die pH-Aktivitätskurven der Peroxidase bei Anwesenheit unterschiedlicher H_2O_2 -Konzentrationen dargestellt. Mit steigendem H_2O_2 -Gehalt in der Testlösung ist eine deutliche Verschiebung des jeweiligen pH-Optimums gegen den sauren pH-Bereich festzustellen. Unter den gegebenen Reaktionsbedingungen wird die höchste Peroxidaseaktivität mit einer H_2O_2 -Konzentration von 1–3 mmol/l bei einem pH-Wert im Bereich von 3,8–4,4 erreicht.

Werden die Resultate der Abbildung 7 nach der Darstellungsweise von *Lineweaver-Burk* aufgezeichnet (Abb. 8), so kann für die untersuchten pH-Werte sowohl die maximal mögliche Reaktionsgeschwindigkeit als auch die H_2O_2 -Affinität der Peroxidase als *Michaelis*-Konstante (K_m) direkt abgelesen werden.

Abb. 7. pH-Aktivitätskurven der Peroxidase bei Anwesenheit verschiedener H_2O_2 -Konzentrationen. 200 ng/l Peroxidase wurde während 30 Minuten bei 22 °C in 0,2 mol/l Kaliumcitratpuffer bei den angegebenen pH-Werten mit 1,0 mmol/l 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin und unterschiedlichen H_2O_2 -Konzentrationen inkubiert und anschließend die Absorbanz bei der Wellenlänge 370 nm photometrisch gemessen.

Abb. 8. Michaelis-Konstante der Peroxidase für H_2O_2 bei verschiedenen pH-Werten. Die Resultate der Abbildung 7 nach der Darstellungsweise von Lineweaver-Burk.

Im pH-Bereich von 3,5–4,5 nimmt die H_2O_2 -Affinität der Peroxidase stark ab:

pH 3,5: $K_m = 0,85 \text{ mmol/l}$,

pH 4,0: $K_m = 1,58 \text{ mmol/l}$,

pH 4,25: $K_m = 2,51 \text{ mmol/l}$,

pH 4,5: $K_m = 3,33 \text{ mmol/l}$.

Im pH-Bereich von 4,5–6,0 ist die Affinität der Peroxidase zum H_2O_2 identisch und zeigt eine Michaelis-Konstante $K_m = 3,33 \text{ mmol/l}$.

In Abbildung 9 sind die Zeit-Aktivitätskurven der Peroxidase bei Anwesenheit unterschiedlicher H_2O_2 -Konzentrationen in der Testlösung dargestellt. Diese Resultate zeigen, daß mit steigender H_2O_2 -Konzentration einerseits eine höhere Anfangsaktivität der eingesetzten Peroxidase festzustellen ist, daß aber andererseits während der Reaktionsdauer die Peroxidaseaktivität schneller abnimmt, bedingt durch die H_2O_2 -Inaktivierung des Enzyms. Zur Festsetzung der optimalen H_2O_2 -Konzentration muß demnach auch die Inkubationsdauer der Peroxidase in der Testlösung berücksichtigt werden.

Das 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin-Peroxidase-System kann auch zur quantitativen Bestimmung von H_2O_2 eingesetzt werden: In einer Photometerküvette von

Abb. 9. Peroxidaseaktivität in Abhängigkeit zur H_2O_2 -Konzentration und zur Reaktionsdauer. 200 ng/l Peroxidase wurden bei einer Reaktionstemperatur von 22 °C in 0,2 mol/l Kaliumcitratpuffer vom pH 3,95 mit 1,0 mmol/l 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin und verschiedenen H_2O_2 -Konzentrationen inkubiert, wobei die Absorbanz der Testlösung bei der Wellenlänge 370 nm während der 30-minütigen Reaktion verfolgt wurde.

10 mm Schichtdicke werden 0–40 $\mu\text{mol/l}$ H_2O_2 in 0,2 mol/l Kaliumcitratpuffer vom pH 3,95 bei Anwesenheit von 1,0 mmol/l 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin durch Zugabe von 20 mg/l Peroxidase katalytisch vollständig umgesetzt. Die Absorbanz der Testlösung wird bei der Wellenlänge 370 nm gemessen. An Hand einer mitgeführten Standardreihe kann die H_2O_2 -Konzentration in der Probe direkt abgelesen werden. Die Nachweisgrenze dieses enzymatischen H_2O_2 -Tests beträgt bei einem Meßbereich von 0–40 $\mu\text{mol/l}$ etwa 2 $\mu\text{mol/l}$ H_2O_2 .

Peroxidaseaktivität in Abhängigkeit vom Puffersystem

Unter sonst identischen Testbedingungen (3,0 mmol/l H_2O_2 , 1,0 mmol/l 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin pH 3,95 und 25 °C) wird mit je 0,2 mol/l Kaliumcitrat und Kaliumacetat eine gleich hohe Peroxidaseaktivität gemessen, während die Peroxidase in 0,2 mol/l Kaliumphosphat um 10–15% weniger aktiv ist.

Der Einfluß der Kaliumcitratkonzentration auf die Peroxidaseaktivität wurde untersucht und dabei festgestellt, daß mit steigendem Gehalt an Kaliumcitrat in der Testlösung sowohl die Aktivität wie auch die Inaktivierungsgeschwindigkeit der Peroxidase zunehmen. Bei einer 30-minütigen Reaktionsdauer wird die höchste Peroxidaseaktivität mit einer Kaliumcitratkonzentration zwischen 100–200 mmol/l erreicht.

Peroxidaseaktivität in Abhängigkeit der Reaktionstemperatur

Die katalytische Aktivität der Enzyme ist allgemein sehr stark von der Reaktionstemperatur abhängig. So bewirkt generell eine Erhöhung der Temperatur um 1 °C innerhalb des Temperaturbereichs von 0 °C bis etwa 45 °C einen Anstieg der enzymatischen Reaktionsgeschwindigkeit um 5–15%. Daher ist für die Enzymbestimmung die genaue Einhaltung der vorgeschriebenen Inkubationstemperatur eine wesentliche Voraussetzung für korrekte Resultate.

Die katalytische Reaktion der Peroxidase mit den Substraten H_2O_2 und 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin weist eine völlig anders geartete Temperaturabhängigkeit auf, wie dies aus den Resultaten der Abbildung 10 deutlich wird. Unter den gegebenen Reaktionsbedingungen wird die höchste Peroxidaseaktivität bei einer Inkubationsdauer von 30 Minuten im Temperaturbereich von 20–25 °C gemessen. Generell ist festzustellen, daß mit steigender Reaktionstemperatur die Zeit-Aktivitätskurven der Peroxidase im Laufe der 30-minütigen Reaktionsdauer immer stärker abflachen. Diese komplexe Temperaturabhängigkeit der

Abb. 10. Peroxidaseaktivität in Abhängigkeit zur Inkubationstemperatur.

150 ng/l Peroxidase wurde bei unterschiedlichen Reaktionstemperaturen in 0,2 mol/l Kaliumcitratpuffer vom pH 3,95 mit 3 mmol/l H_2O_2 und 1,0 mmol/l 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin inkubiert, wobei während der 30-minütigen Reaktionsdauer die Absorbanz bei der Wellenlänge 370 nm laufend gemessen wurde.

Peroxidaseaktivität wird dominiert von der Enzym-inaktivierung, die mit steigender Temperatur wesentlich schneller zunimmt als die katalytische Reaktion des noch aktiven Enzyms.

Auf Grund der aufgezeigten Temperaturabhängigkeit kann die Peroxidaseaktivität unter den gegebenen Reaktionsbedingungen im Temperaturbereich von 20–25 °C durchgeführt werden.

Reagens zum Abstoppen der Peroxidaseaktivität

Die Peroxidase wird häufig als Markierungsenzym bei enzym-immunologischen Tests verwendet. Bei der Durchführung dieser Tests erfolgt die Bestimmung der Peroxidase nicht nach der kontinuierlichen, sondern nach der Zwei-Punkt-Methode. Bei diesem Vorgehen ist es vorteilhaft, wenn nach einer bestimmten Reaktionsdauer die peroxidatische Aktivität gestoppt und die während der Indikatorreaktion entstandene Farbintensität soweit stabilisiert werden kann, so daß die photometrische Messung – innerhalb einer gewissen Dauer – zeitunabhängig durchgeführt werden kann.

Durch Senken des pH-Wertes der Testlösung auf pH 1,0 wird die katalytische Aktivität der Peroxidase sogleich und vollständig gestoppt und das gebildete, blaugefärbte Radikalkation (II) wird zum gelbgefärbten 3,3',5,5'-Tetramethyl-1,1'-diphenochinon-4,4'-diimoniumion (III) übergeführt, das eine wesentlich höhere Absorption aufweist und bei der gebräuchlichen Wellenlänge 450 nm photometrisch gemessen werden kann. Eine ausreichende pH-Senkung und damit zusammenhängend die größtmögliche Steigerung der Farbintensität (vgl. Abb. 5) kann nur mit starken Säuren erreicht werden. Von den geprüften Abstoppreagenzien (HCl , H_2O_2 , HNO_3 , H_3PO_4) wird mit Schwefelsäure die beste Farbstabilität erreicht. Die zum Abstoppen der Peroxidaseaktivität verwendeten Säuren müssen frei sein von Eisenionen. Die zum Erreichen des pH-Wertes von 1,0 erforderliche Schwefelsäurekonzentration ist abhängig vom Volumenverhältnis der Testlösung zum Abstoppreagens.

Die katalytische Aktivität der Peroxidase kann auch durch Erhöhung der H_2O_2 -Konzentration in der Testlösung abgestoppt werden. Bei Anwesenheit von 100 mmol/l H_2O_2 wird die Peroxidase praktisch sogleich und vollständig inaktiviert, die Farbintensität des Radikalkation (II) wird dadurch stabilisiert und die Absorbanz kann innerhalb von 60 Minuten bei den Wellenlängen 370 nm oder 650 nm photometrisch gemessen werden.

Optimierte Bestimmungsmethode der Peroxidase

Auf Grund der experimentellen Daten wird folgende Testmethode zur quantitativen Bestimmung der Peroxidase vorgeschlagen: Die zu bestimmende Peroxidase (0–200 pg) wird in 1,0 ml Substratpuffer (0,2 mol/l Kaliumcitrat vom pH 3,95 mit 3 mmol/l H_2O_2 und 1,0 mmol/l 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin) während 30 Minuten bei 20–25 °C lichtgeschützt inkubiert. Nach Ablauf der Reaktionszeit werden zum Abstoppen der peroxidatischen Aktivität 1,0 ml 1 mol/l Schwefelsäure zugemischt und die Farbintensität innerhalb von 60 Minuten bei der Wellenlänge 450 nm photometrisch gemessen.

Literatur

- Holland, V., Saunders, B., Rose, F. & Walpole, A. (1974) *Tetrahedron* 30, 3299–3302.
- Garner, R., Walpole, A. & Rose, F. (1975) *Cancer Letters* 1, 39–42.
- Standeford, J. & Vanderjagt, D. (1977) *Clin. Chem.* 23, 749–751.
- Lijana, R. & Williams, M. (1979) *J. Lab. Clin. Med.* 94, 266–276.

Abbildung 11 zeigt die lineare Proportionalität der im Test eingesetzten Peroxidasekonzentration zur gemessenen Farbintensität nach der 30-minütigen Enzymreaktion, wobei einerseits vor der Zugabe von Schwefelsäure die Absorbanz bei der Wellenlänge 370 nm und andererseits nach dem Abstoppen der Peroxidaseaktivität die Farbintensität bei der Wellenlänge 450 nm photometrisch gemessen wurde. Bei einem Meßbereich von 0–200 pg Peroxidase kann unter den gegebenen Testbedingungen das Enzym mit einer Nachweisgrenze von etwa 10 pg quantitativ bestimmt werden. Die Reproduzierbarkeit innerhalb einer Meßserie kann mit einem Variationskoeffizient von 0,7–4,5% als gut bezeichnet werden.

Abb. 11. Abhängigkeit der Absorptionsdifferenz von der eingesetzten Peroxidasekonzentration und der Testmethode.

Die angegebene Peroxidasekonzentration wurde in 0,2 mol/l Kaliumcitratpuffer vom pH 3,95 mit 3 mmol/l H_2O_2 und 1,0 mmol/l 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin während 30 Minuten bei 22 °C inkubiert. Nach der Messung der Absorbanz bei der Wellenlänge 370 nm (---) wurde die katalytische Reaktion durch Zugabe von 1,0 ml 0,5 mol/l Schwefelsäure pro 1,0 ml Testlösung abgestoppt und die Farbintensität nochmals bei der Wellenlänge 450 nm gemessen. (—)

Dr. H. Gallati
Zentrale Forschungseinheiten
F. Hoffmann-La Roche & Co. AG
CH-4000 Basel