J. Clin. Chem. Clin. Biochem.
Vol. 20, 1982, pp. 221–225

Peroxidase aus Meerrettich: Kinetische Studien und Optimierung der Aktivitätsbestimmung mit den Substraten H_2O_2 und *o*-Phenylendiamin

Von H. Gallati und H. Brodbeck

Diagnostische Forschungs- und Entwicklungsabteilung der F. Hoffmann-La Roche & Co. AG Basel (Schweiz)

(Eingegangen am 9. Juni/26. Oktober 1981)

Zusammenfassung: Zur Optimierung der Aktivitätsbestimmung der Peroxidase, eines häufig benutzten Markierungs- und Indikatorenzyms für Enzymimmunoassays, wird die Kinetik der katalytischen Reaktion in Abhängigkeit der H_2O_2 - und der *o*-Phenylendiamin-Konzentration bei verschiedenen pH-Werten untersucht. Zudem werden die Einflüsse der Puffersysteme, der Reaktionstemperatur und der Reaktionsdauer abgeklärt. Auf Grund dieser Ergebnisse wird ein Testverfahren vorgeschlagen, das erlaubt, die Peroxidase bis zu einer Konzentration von 2 ng/l zu bestimmen.

Horseradish peroxidase:

*Kinetic studies and optimization of the activity determination with the substrates H_2O_2 and *o*-phenylenediamine*

Summary: To optimize the determination of the activity of peroxidase, an enzyme often used as a marker and indicator system in enzyme immunoassays, the kinetics of the catalytic reaction and its dependence on the H_2O_2 and *o*-phenylenediamine concentration at various pH values were investigated. In addition, the influence of buffer systems, the reaction temperature, and the reaction time were determined. Based on the results, a test procedure is proposed for the measurement of peroxidase down to concentrations of 2 ng/l.

Einführung

Die Nachweisgrenze bei den enzym-immunologischen Tests (EIA) wird wesentlich beeinflusst von der erreichbaren Empfindlichkeit der enzymatischen Indikatorreaktion. Mit der Peroxidase aus Meerrettich (Donor: hydrogenperoxide oxidoreductase, EC 1.11.1.7) als häufigstem Markierungs- und Indikatorenzym stehen neben einer hohen katalytischen Aktivität zugleich auch einfache und sehr empfindliche Nachweismethoden zur Verfügung. So kann z. B. mit den Substraten H_2O_2 und 2,2'-Azino-di-(3-ethyl-benzthiazolin-sulfonsäure-(6)) (ABTS) die Peroxidase bis zu einer Konzentration von 10 ng/l gemessen werden (1).

Die vorliegende Arbeit berichtet vom erfolgreichen Versuch, die Sensitivität der enzym-immunologischen Tests noch weiter zu steigern. Als Ergebnis kann ein einfaches Testverfahren vorgeschlagen werden, das erlaubt, die Peroxidase bis zu einer Konzentration von 2 ng/l zu bestimmen.

Zur Optimierung der Aktivitätsbestimmung der Peroxidase wurde vorerst die Kinetik der katalytischen Reaktion in Abhängigkeit von der H_2O_2 - und der *o*-Phenyl-

endiamin-Konzentration bei verschiedenen pH-Werten untersucht. Zusätzlich wurde die Abhängigkeit der enzymatischen Substratumsetzung von der Reaktionstemperatur, von der Reaktionsdauer sowie von verschiedenen Puffersystemen abgeklärt. Dann wurde auch die Möglichkeit zum sofortigen und vollständigen Abstoppen der peroxidatischen Aktivität und zur Stabilisierung der entstandenen Farbintensität untersucht.

Material und Methoden

Peroxidase aus Meerrettich (Donor: hydrogen-peroxide oxidoreductase, EC 1.11.1.7) wurde in lyophilisierter Form von Boehringer Mannheim bezogen. Die Reinheitszahl dieses Präparates ist mit „ca. 3,0“ angegeben. Das Enzym wurde ohne weitere Reinigung eingesetzt.

Als *o*-Phenylendiamin wurde das 1,2-Phenylendiamin von Merck (Best.Nr. 7243) benützt. In einer speziellen Studie wurde dieses Substrat mit dem *o*-Phenylendiamin von Fluka (Best.Nr. 78410) sowie mit dem *o*-Phenylendiamin-dihydrochlorid von Sigma (P-3888) und von Fluka (Best.Nr. 78440) verglichen.

H_2O_2 wurde in einer 300 g/kg-Lösung von der Firma Lehner, Muttentz (Schweiz), bezogen.

Die übrigen Chemikalien waren von analytischer Reinheit.

Für die Aktivitätsbestimmung der Peroxidase werden in einer Photometer-Meßküvette von 10 mm Schichtdicke zu 1,0 ml Testlösung (0,1 mol/l Natriumcitratpuffer vom pH 5,0 mit 15 mmol/l *o*-Phenylendiamin und 5 mmol/l H_2O_2) 0,05 ml Peroxidaselösung (Enzymkonzentration in der Testlösung bis 100 ng/l) zugemischt und bei 25 °C die Absorptionzunahme während 30 Minuten bei der Wellenlänge 436 nm photometrisch gemessen. Abweichungen von diesem Testvorgehen werden bei den einzelnen Versuchen speziell erwähnt.

Resultate und Diskussion

Spektren des *o*-Phenylendiamin und des Kondensationsprodukts 2,2'-Diamino-azobenzol

In Anlehnung an die Arbeit von Y. Omote et al. (2) über die Oxidation des *o*-Phenylendiamin zum 2,2'-Diamino-azobenzol in Anwesenheit von Natriumhydrid kann angenommen werden, daß auch unter der katalytischen Einwirkung der Peroxidase das *o*-Phenylendiamin zum 2,2'-Diamino-azobenzol kondensiert wird.

In Abbildung 1 sind die Spektren des *o*-Phenylendiamin sowie des 2,2'-Diamino-azobenzols aufgezeichnet. Der bei der peroxidatischen Oxidation gebildete Farbstoff zeigt ein Absorptionsmaximum bei 445 nm. Bei Verwendung

Abb. 1. Absorptionsspektren des *o*-Phenylendiamins und des Kondensationsproduktes 2,2'-Diamino-azobenzol. Von 15 mmol/l *o*-Phenylendiamin vor (---) und nach (—) der 60-minütigen katalytischen Einwirkung von 50 ng/l Peroxidase in Anwesenheit von 5 mmol/l H_2O_2 und 0,1 mol/l Natriumcitratpuffer vom pH 5,0 wurde das Spektrum im Wellenlängenbereich von 380 nm–700 nm aufgenommen.

von gebräuchlichen Filtern für die photometrische Messung ist die Absorption bei 436 nm um 5%, bei 405 nm um 44% und bei 492 nm um 56% geringer, was sich entsprechend auf die Empfindlichkeit der Aktivitätsbestimmung der Peroxidase auswirkt.

Für die folgenden Versuche wird die Aktivitätsbestimmung der Peroxidase bei der Wellenlänge 436 nm durchgeführt.

Bei den enzym-immunologischen Bestimmungen von Antigen oder Antikörpern nach der ELISA-Technik muß wegen der Heterogenität des Systems und wegen der geringen Reaktionsgeschwindigkeit die Aktivität der Peroxidase nach der „Zwei-Punkt-Methode“ bestimmt werden. Dabei ist es von praktischem Nutzen, wenn die Enzymreaktion nach Ablauf der festgesetzten Inkubationszeit abgestoppt und die gebildete Farbintensität innerhalb einer gewissen Zeit photometrisch gemessen werden kann. Bei Verwendung von H_2O_2 und *o*-Phenylendiamin als Substrat kann durch eine einfache pH-Senkung der Testlösung sowohl die katalytische Aktivität der Peroxidase sofort und vollständig abgestoppt wie auch die gebildete Farbintensität stabilisiert werden. Die Abbildung 2 zeigt die Spektren des 2,2'-Diamino-azobenzol bei verschiedenen pH-Werten. Die Spektren bilden bei der Wellenlänge 452 nm einen isosbestischen Punkt, was als charakteristische Eigenschaft für einen

Abb. 2. Absorptionsspektren des 2,2'-Diamino-azobenzols bei verschiedenen pH-Werten. Nach einer 30-minütigen katalytischen Einwirkung von 50 ng/l Peroxidase auf 15 mmol/l *o*-Phenylendiamin in Anwesenheit von 5 mmol/l H_2O_2 und von 0,1 mol/l Natriumcitratpuffer wurde durch Zugabe von konzentrierter Salzsäure der pH-Wert der Testlösung vom pH 5,0 (—) auf 2,0 (·····), dann auf 1,5 (---) und auf 1,0 (—) gesenkt. Von diesen Lösungen sind die Absorptionsspektren im Wellenlängenbereich von 350 nm bis 600 nm aufgenommen.

pH-Indikator gilt. Durch die pH-Senkung nimmt die Farbintensität des 2,2'-Diamino-azobenzol wesentlich zu und zeigt ein Absorptionsmaximum bei der Wellenlänge 492 nm.

Zum Abstoppen der Peroxidaseaktivität, zur Stabilisierung und zugleich Intensivierung der Farbintensität eignet sich jede Säure, welche den pH-Wert der Testlösung bis oder unter pH 1,0 abzusenken vermag. Aus Praktikabilitätsgründen bevorzugen wir Salzsäure, auch wenn mit Schwefelsäure eine etwas bessere Stabilisierung der Farbintensität erreicht wird.

Peroxidaseaktivität in Abhängigkeit vom pH-Wert und vom Puffersystem

Bei einer gegebenen Substratkonzentration von 5 mmol/l H_2O_2 und 15 mmol/l *o*-Phenylendiamin zeigt die katalytische Aktivität der Peroxidase beim pH 5,0 ein deutliches pH-Optimum, das von der Inkubationsdauer unabhängig ist (Abb. 3). Innerhalb des untersuchten pH-Bereichs ist die Peroxidase im substratfreien Puffermilieu stabil. Das Enzym wird aber bei Anwesenheit von H_2O_2 langsam inaktiviert, indem die Peroxidase mit dem H_2O_2 einen stabilen und katalytisch inaktiven Komplex bildet (3–5).

In Natriumcitratpuffer 0,1 mol/l wird unter sonst identischen Testbedingungen (5 mmol/l H_2O_2 , 15 mmol/l *o*-Phenylendiamin, pH 5,0 und 25 °C) die höchste Peroxidaseaktivität gemessen. Demgegenüber ist die peroxidatische Aktivität in Natriumacetat 0,1 mol/l um 28%, in Natriumtartrat 0,1 mol/l um 30% und in Natriumphthalat 0,1 mol/l um 40% geringer.

Abb. 3. pH-Aktivitätskurve der Peroxidase in Abhängigkeit der Inkubationsdauer. Aktivitätsbestimmung von 80 ng/l Peroxidase in 0,1 mol/l Natriumcitrat mit 15 mmol/l *o*-Phenylendiamin und 5 mmol/l H_2O_2 bei den angegebenen pH-Werten und der entsprechenden Inkubationsdauer. Reaktionstemperatur: 25 °C.

Natriumcitrat im Konzentrationsbereich von 50 bis 400 mmol/l hat keinen Einfluß auf die peroxidatische Aktivität. (Hingegen muß entsprechend der eingesetzten Pufferkapazität mehr oder dann konzentriertere Säure zum Abstoppen der enzymatischen Reaktion und zum Erreichen eines pH-Wertes von 1,0 verwendet werden.)

Peroxidaseaktivität in Abhängigkeit zur H_2O_2 -Konzentration

Die Peroxidaseaktivität wurde bei Anwesenheit von 15 mmol/l *o*-Phenylendiamin in Abhängigkeit der H_2O_2 -Konzentration im pH-Bereich von 4,0 bis 6,0 untersucht und die Resultate nach der Darstellungsweise von Lineweaver-Burk in der Abbildung 4 zusammengefaßt.

Unter den gegebenen Testbedingungen ist die Affinität der Peroxidase zum H_2O_2 im pH-Bereich von 4,0 bis 5,0 identisch und zeigt eine Michaelis-Konstante $K_m = 3,6$ mmol/l. Mit steigendem pH-Wert nimmt die H_2O_2 -Affinität der Peroxidase stark zu: pH 5,5: $K_m = 2,5$ mmol/l / pH 6,0: $K_m = 1,7$ mmol/l.

Die Abbildung 5 zeigt die Affinität der Peroxidase sowohl zum H_2O_2 wie auch zum *o*-Phenylendiamin ($pK_m = \log K_m$) in Korrelation zu den entsprechenden pH-Werten. Die beiden parallel verlaufenden Kurven zeigen beim pH 5,0 einen markanten Knick, wobei die Affinität der beiden Substrate zur Peroxidase mit steigendem pH-Wert gleichsinnig und stark zunimmt. Nach M. Dixon (6) bedeutet dieser Kurvenverlauf, daß die Ionisierung der für die Enzymaktivität entscheidenden Gruppe der Peroxidase zunimmt.

Abb. 4. Michaelis-Konstante der Peroxidase für H_2O_2 bei verschiedenen pH-Werten. Aktivitätsbestimmung von 100 ng/l Peroxidase in 0,1 mol/l Natriumcitrat, 15 mmol/l *o*-Phenylendiamin und den entsprechenden H_2O_2 -Konzentrationen bei den angegebenen pH-Werten. Reaktionstemperatur: 25 °C. Darstellung nach Lineweaver-Burk.

Abb. 5. Abhängigkeit der pK_m -Werte für H_2O_2 und o -Phenyldiamin vom pH. Die aus den Abbildungen 4 und 7 errechneten Michaeliskonstanten K_m werden als $pK_m (= -\log K_m)$ in Abhängigkeit zum pH-Wert aufgetragen.

Zur Festsetzung der optimalen H_2O_2 -Konzentration dürfen nicht nur die Resultate der Abbildung 4 berücksichtigt werden, die besagen, daß bei pH 5,0 die Peroxidaseaktivität mit steigender H_2O_2 -Konzentration zunimmt. Denn, wie die Resultate der Abbildung 6 zeigen, nimmt mit höherem H_2O_2 -Gehalt auch die Inaktivierungsgeschwindigkeit der Peroxidase zu. Zur Festsetzung der optimalen H_2O_2 -Konzentration muß demnach auch die Inkubationsdauer der Peroxidase berücksichtigt werden. So wird bei einer Inkubationsdauer von 30 Minuten – bei sonst identischen Reak-

Abb. 6. Peroxidaseaktivität in Abhängigkeit zur H_2O_2 -Konzentration und zur Reaktionsdauer. 80 ng/l Peroxidase werden bei einer Reaktionstemperatur von 25 °C in 0,1 mol/l Natriumcitrat vom pH 5,0 mit 15 mmol/l o -Phenyldiamin und verschiedenen H_2O_2 -Konzentrationen inkubiert und die Absorption bei der Wellenlänge 436 nm während 30 Minuten verfolgt.

tionsbedingungen – mit 5 mmol/l H_2O_2 die höchste Farbintensität erreicht. (Für 5 Minuten wären es 10 mmol/l H_2O_2 und für 60 Minuten 2,5 mmol/l.)

Das Substrat o -Phenyldiamin bietet der Peroxidase keinen Schutz vor der H_2O_2 -Inaktivierung.

Peroxidaseaktivität in Abhängigkeit zur o -Phenyldiamin-Konzentration

In Abbildung 7 ist die Abhängigkeit der Peroxidaseaktivität von der o -Phenyldiamin-Konzentration im untersuchten pH-Bereich von 4,0 bis 6,0 nach der Darstellungsweise von *Lineweaver-Burk* zusammengefaßt. Daraus kann die Affinität der Peroxidase zum o -Phenyldiamin als K_m , wie auch die maximal mögliche Reaktionsgeschwindigkeit abgelesen werden. Die Korrelation der Affinität des o -Phenyldiamins zur Peroxidase im untersuchten pH-Bereich ist in Abbildung 5 dargestellt und oben kommentiert. Festzuhalten ist, daß zur Substratsättigung der Peroxidase wesentlich mehr o -Phenyldiamin eingesetzt werden muß als H_2O_2 . Die maximal mögliche Reaktionsgeschwindigkeit kann wegen der Substrathemmung hoher o -Phenyldiamin-Konzentrationen nicht erreicht werden. Eine optimale Peroxidaseaktivität wird beim pH 5,0 und in Anwesenheit von 5 mmol/l H_2O_2 mit 15 mmol/l o -Phenyldiamin erhalten.

Die Resultate der Tabelle 1 zeigen wesentliche Unterschiede der Peroxidaseaktivität mit verschiedenen o -Phenyldiamin-Präparaten. Die höchste Aktivität wird mit dem o -Phenyldiamin von Merck gemessen,

Abb. 7. Michaelis-Konstante der Peroxidase für o -Phenyldiamin bei verschiedenen pH-Werten. Aktivitätsbestimmung von 50 ng/l Peroxidase in 0,1 mol/l Natriumcitrat, 5 mmol/l H_2O_2 und den entsprechenden Konzentrationen an o -Phenyldiamin bei den angegebenen pH-Werten. Reaktionstemperatur: 25 °C. Darstellung nach *Lineweaver-Burk*.

Tab. 1. Abhängigkeit der Peroxidaseaktivität vom eingesetzten *o*-Phenylendiamin-Präparat.

In 0,1 mol/l Natriumcitrat vom pH 5,0 wird die Aktivität von 100 ng/l Peroxidase in Anwesenheit von 5 mmol/l H_2O_2 und 15 mmol/l *o*-Phenylendiamin unterschiedlicher Präparate bei einer Raumtemperatur von 25 °C photometrisch gemessen und die Absorptionsdifferenz pro 30 Minuten bei der Wellenlänge 436 nm angegeben.

Präparat des <i>o</i> -Phenylendiamin	Peroxidase-Aktivität ($\Delta A_{30 \text{ min}/436 \text{ nm}}$ (25 °C))	(%)
<i>o</i> -Phenylendiamin: Merck	0,960	100
<i>o</i> -Phenylendiamin: Fluka	0,723	75
<i>o</i> -Phenylendiamin/2 HCl: Fluka	0,383	40
<i>o</i> -Phenylendiamin/2 HCl: Sigma	0,333	35

während mit dem *o*-Phenylendiamin-dihydrochlorid generell tiefere Werte erreicht werden. Die Ursache für dieses unterschiedliche Verhalten des *o*-Phenylendiamin konnte noch nicht abgeklärt werden. Aufgrund dieser Resultate wurde für unsere Versuche stets das Substrat von Merck eingesetzt.

Peroxidaseaktivität in Abhängigkeit zur Inkubationstemperatur

Allgemein ist die katalytische Aktivität der Enzyme sehr stark von der Reaktionstemperatur abhängig. Eine Erhöhung der Temperatur um 1 °C bewirkt generell einen Anstieg der Reaktionsgeschwindigkeit um 5–15%.

Die katalytische Reaktion der Peroxidase mit den Substraten H_2O_2 und *o*-Phenylendiamin unter den gegebenen Reaktionsbedingungen zeigt eine anders geartete Temperaturabhängigkeit. Während im Temperaturbereich von 18–26 °C praktisch eine gleiche Peroxidaseaktivität gemessen wird, sinkt diese bei höheren Reaktionstemperaturen stark ab. Diese Resultate sind dadurch zu erklären, daß mit steigender Temperatur die Inaktivierung der Peroxidase durch das H_2O_2 schneller zunimmt als die katalytische Substratumsetzung des noch aktiven Enzyms.

Aufgrund dieser Resultate kann die Aktivitätsbestimmung der Peroxidase unter den gegebenen Testbedingungen bei Raumtemperatur durchgeführt werden, ohne daß eine bestimmte Temperatur innerhalb von 18–26 °C eingehalten werden muß.

Literatur

- Gallati, H. (1979) J. Clin. Chem. Clin. Biochem. 17, 1–7.
- Omote, J., Nakada, J., Kobayashi, R. & Sugiyama, N. (1971) Chem. Ind. 35, 996.
- Maehly, A. C. (1955) Meth. Enzymol. 2, 801–813.
- Yamazaki, I., Yokota, K. & Nakajima, R. (1965) In: 'Oxidases Related Redox Systems' (King, T., Mason, H. & Morrison, M. eds.), New York, 485–504.

Optimierte Bestimmungsmethode der Peroxidase

Zur quantitativen Bestimmung der Peroxidase wird das Enzym in 1,0 ml Substrat-Pufferlösung (0,1 mol/l Natriumcitrat vom pH 5,0 mit 5 mmol/l H_2O_2 und 15 mmol/l *o*-Phenylendiamin) während 30 Minuten bei Raumtemperatur (18–26 °C) lichtgeschützt inkubiert. Nach Ablauf der Reaktionszeit werden zum Abstoppen der katalytischen Aktivität 1,0 ml Salzsäure 4 mol/l zugemischt und die Farbintensität innerhalb von 60 Minuten bei der Wellenlänge 492 nm gemessen.

Die Abbildung 8 zeigt die lineare Proportionalität der Peroxidasekonzentration zur gemessenen Farbintensität nach einer enzymatischen Reaktion von 30 Minuten. Die Nachweisgrenze liegt bei 2 ng/l. Der Meßbereich, der bei der Abbildung bis 100 ng/l Peroxidase reicht, kann erweitert werden, indem entweder die Peroxidase entsprechend vorverdünnt wird, oder die Dauer der Peroxidaseaktivität verkürzt und/oder das Volumen zum Abstoppen der katalytischen Reaktion vergrößert wird.

Abb. 8. Abhängigkeit der Absorptionsdifferenz von der Peroxidasekonzentration.

Die angegebenen Peroxidasekonzentrationen werden in 0,1 mol/l Natriumcitrat vom pH 5,0 mit 5 mmol/l H_2O_2 und 15 mmol/l *o*-Phenylendiamin während 30 Minuten bei 25 °C inkubiert. Anschließend wird die katalytische Reaktion durch Zugabe von 1,0 ml 4 mol/l Salzsäure pro 1,0 ml Testlösung abgestoppt und die Farbintensität bei der Wellenlänge 492 nm gemessen.

- Shindler, J., Childs, R. & Bardsley, W. (1976) Eur. J. Biochem. 65, 325–331.
- Dixon, M. (1953) Biochem. J. 55, 161–170.

Dr. H. Gallati
Diagnostische Forschungs- und
Entwicklungsabteilung
F. Hoffmann-La Roche & Co. AG
Grenzacherstr. 124
CH-4002 Basel