

## Eine Methode für den direkten Nachweis von Desoxyribonukleasen nach Elektrophorese in Agargel

Zur Prüfung der Eigenschaften von Enzympräparaten wird immer häufiger die Elektrophorese eingesetzt. Besondere Bedeutung gewinnt sie bei der Untersuchung von multiplen Enzymen (Isoenzyme), obgleich die damit erhaltenen Resultate nicht ohne andere Analysendaten bewertet werden dürfen<sup>1</sup>.

Unter den Nukleasen sind multiple Formen bei den Streptokokken gefunden worden. Es handelt sich um drei Desoxyribonukleasen, die von Streptokokken der Gruppe A in das Nährmedium abgegeben werden. Zu ihrem Nachweis nach elektrophoretischer Auftrennung in Stärke zerlegte WANNAMAKER<sup>2</sup> den Stärkeblock in Fraktionen, eluierte diese und bestimmte in den Eluaten die Fermentaktivität. Ein einfacherer Nachweis, der die gleichzeitige Untersuchung vieler Proben ohne grossen Aufwand ermöglicht, wird hier beschrieben. Er dürfte sich ganz allgemein nicht nur für den Nachweis von Desoxyribonukleasen sondern darüberhinaus auch für Ribonukleasen eignen.

*Prinzip.* Die Elektrophorese erfolgt in Agargel. Nach beendeter Trennung wird parallel zur Wanderungsrichtung ein Agarstreifen ausgestanzt und in eine Schale übertragen, wo er mit einem Gemisch aus Agar und Desoxyribonukleinsäure umgeben wird. Nach Bebrütung bei 37° wird der Agar mit Salzsäure überschichtet. An den Stellen, wo im Elektropherogramm eine Desoxyribonuklease vorlag, ist der Streifen von einer Verdauungszone umgeben, während die unverdaute Desoxyribonukleinsäure in fädig-flockiger Form ausfällt.

Die Anwendung der Methode soll am Beispiel des Nachweises der erwähnten extrazellulären Desoxyribonukleasen von *Streptococcus pyogenes* erläutert werden:

Glasplatten von 4.5 × 23 cm werden in einer Schale mit einer ca. 3 mm hohen Schicht von 1.5 % Agar in 0.05 M Glycin-NaCl-Puffer, pH 9.0, bedeckt. Aus dem erstarrten Agar wird ein Loch von 2 × 15 mm so ausgestanzt, dass als Wanderungsstrecke in Richtung der Anode zwei Drittel der gesamten Streifenlänge verbleiben. Dieses Loch wird mit einem Gemisch aus gleichen Teilen 3 %igem Agar (abgekühlt auf 45°) und dialysierter Enzymlösung gefüllt. Die Elektrophorese der Proben erfolgt mit gleichem Puffer bei einer Spannung von 150 V im Laufe von ca. 16 Std. Dabei liegen die Glasplatten auf einem mit fliessendem Wasser gekühlten Metallbehälter. Nach beendeter Auftrennung wird aus dem Agar parallel zur Wanderungsrichtung ein Streifen von 5 × 140 mm herausgestanzt und auf eine Glasplatte von 15 × 15 cm übertragen. Bis zu sechs solcher Streifen können auf eine Platte gebracht werden, wobei jedoch zwischen ihnen ein Abstand von etwa 2 cm bleiben muss. Nachdem auf die Platte ein Plexiglasrahmen von 1.5 cm Höhe aufgesetzt wurde, füllt man auf dem nivellierten Giesstisch in die Zwischenräume der Agarstreifen 40 ml eines Gemisches aus gleichen Teilen verflüssigtem 4 %igem Wasseragar und 0.6 % Desoxyribonukleinsäure (hergestellt aus Kalbsthymus<sup>3</sup>) in 0.028 M Veronal-Azetatpuffer (Mg<sup>2+</sup>-Endkonzentration 0.03 M) ein. Nach 16–24stündigem Bebrüten der abgedeckten Platten bei 37° überschichtet man den Agar mit 0.5 N-Salzsäure und spült nach 15 Min mit Wasser nach. Die Lage der auftretenden Verdauungszonen kann durch Fotografie bei Dunkelfeldbeleuchtung oder auch durch einfaches Durchpausen auf der Rückseite der Glasplatte festgehalten werden.

Fig. 1 zeigt die extrazellulären Desoxyribonukleasen des Streptokokkenstammes

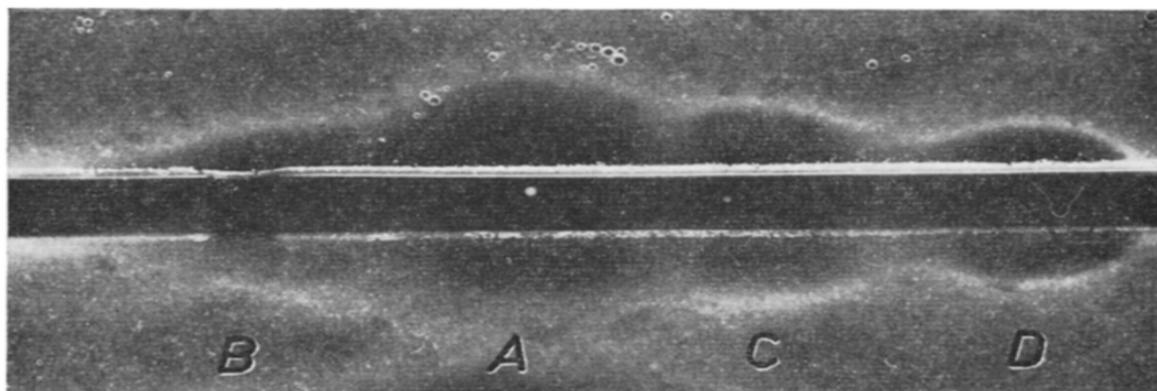


Fig. 1. Die extrazellulären Desoxyribonukleasen des Stammes S 84 von *Streptococcus pyogenes*.

S 84 (Typ 3). Dieser Stamm entlässt in das Nährmedium vier verschiedene Desoxyribonukleasen, welche sich nicht nur elektrophoretisch sondern auch in anderen Eigenschaften unterscheiden. Drei von ihnen können mit den von WANNAMAKER<sup>2</sup> beschriebenen Enzymen A, B und C identifiziert werden. Das vierte entspricht wahrscheinlich dem von AYOUB UND WANNAMAKER<sup>4</sup> erwähnten Enzym und soll deshalb Enzym D genannt werden.

Mit dem Rest des Elektrophoresestreifens kann man zusätzliche Untersuchungen anstellen (z.B. Bestimmung des pH-Optimums und anderer Fermenteigenschaften). Hierzu wird der Streifen in zentimeterbreite Fraktionen zerlegt und diese tiefgefroren. Die nach dem Auftauen abgeschiedene Flüssigkeit (evtl. Zugabe eines kleinen Volumens Puffer) enthält das Ferment.

*Institut für Mikrobiologie und experimentelle Therapie,  
Jena (Deutschland)*

M. WAGNER

<sup>1</sup> N. O. KAPLAN, *Bacteriol. Rev.*, 27 (1963) 155.

<sup>2</sup> L. W. WANNAMAKER, *J. Exptl. Med.*, 107 (1958) 797.

<sup>3</sup> E. R. M. KAY, N. S. SIMMONS UND A. L. DOUNCE, *J. Am. Chem. Soc.*, 74 (1952) 1724.

<sup>4</sup> E. M. AYOUB UND L. W. WANNAMAKER, *Pediatrics*, 29 (1962) 527.

Eingegangen den 21. Januar 1964

*J. Chromatog.*, 15 (1964) 107-108

### The analysis of straight-chain ( $n-C_1-C_9$ ) carboxylic acids by a thin-layer chromatographic method

Straight chain carboxylic acids of low molecular weight are frequently encountered as by-products of biological and chemical processes. The identification of individual acids of this type can be difficult, particularly as they often occur, or are recovered, in dilute aqueous solution. Straight chain carboxylic acids have been analysed by paper chromatography<sup>1-8</sup>. A thin-layer chromatographic method has been described<sup>9</sup> for which it is shown that for the carboxylic acids of even carbon numbers 4 to 18 and

*J. Chromatog.*, 15 (1964) 108-110