

Ein dünn-schichtchromatographisches Verfahren zur quantitativen Bestimmung von Aminosäuren und Aminosukzern im Mikromassstab

Die Aminosäuren Alanin, Glutaminsäure und α - ϵ -Diaminopimelinsäure (DAP), sowie die Aminosucker Glucosamin und Muraminsäure sind als konstitutive Bestandteile der Bakterienzellwand bekannt¹. Um diese Substanzen in den enzymatischen Spaltprodukten bakterieller Zellwände nebeneinander, quantitativ und im Mikromassstab analysieren zu können, wurde in Abwandlung bekannter Methoden² das folgende Verfahren ausgearbeitet. Es besteht in einer dünn-schichtchromatographischen Trennung der Substanzen, Anfärbung mit Ninhydrin, Isolierung und Extraktion der Stoffe, Überführung des instabilen Ninhydrinkomplex in den stabilen Ninhydrin-Cadmium-Komplex und einer photometrischen Messung der einzelnen Stoffkomplexe.

Material

Es wurde mit einem künstlichen Gemisch gearbeitet, welches in 1 ml Wasser je 1 mg Alanin, Glutaminsäure, DAP, Glucosamin und Muraminsäure enthielt. Die Aminosäuren und Glucosamin wurden von der Fa. Calbiochem bezogen, die Muraminsäure wurde aus den Zellwänden von *Escherichia coli* B rein dargestellt³. Als Träger-substanz bei der Dünnschichtchromatographie diente Cellulosepulver (300 MN, Macherey, Nagel & Co., Düren). Zum Beschichten der Dünnschichtplatten wurde ein Streichgerät der Fa. Desaga, Heidelberg benutzt.

Methoden

Dünnschichtchromatographie. Als Trägerplatten wurden 4 mm dicke Glasplatten 20 × 20 cm verwendet. Die Platten sind vor jedem Gebrauch durch Einlegen und sorgfältiges Spülen in heisser, konzentrierter Sodalösung fettfrei zu waschen. Die sauberen Platten werden mit einer Cellulosepulversuspension beschichtet; die Schichtdicke beträgt 250 μ . Die Aufschwemmung (15 g Pulver auf 90 ml Wasser) wird vor dem Einfüllen in das Streichgerät 2 Min. in einem Starmix homogenisiert. Die beschichteten Platten werden 15 Std. bei Zimmertemperatur oder in einem Thermostat (Luftumwälzer) nicht über 40° getrocknet und sind dann gebrauchsfertig. (Sollen die Platten aufbewahrt werden, so stellt man sie in einen Exsikkator.) Auf die trockene Platte wird das Substanzgemisch in Konzentrationen zwischen 2.5 und 0.25 μ g pro Substanz punktförmig mit einer 1 μ l Pipette aufgetragen. Durchmesser der Startflecken einheitlich 4 mm (grössere oder kleinere Flecken können bei der Trennung schwänzen), Abstand der Startflecken zum unteren Plattenrand 2 cm, Abstand der Flecken untereinander mindestens 1.5 cm. (Es empfiehlt sich, für eine Versuchsserie stets dieselbe Mikropipette zu benutzen, um Fehler durch Ungenauigkeiten der Pipettenkalibrierung zu vermeiden.)

Die Platten werden durch einen zweimaligen Trennungslauf in Glaströgen mit aufgeschliffenem Deckel (21 × 21 × 5 cm, Fa. Desaga, Heidelberg) bei 25° entwickelt. Trennungsgemisch ist Butanol-Pyridin-Eisessig-Wasser (60:45:4:30, v/v) (monophasisches Gemisch). Die Wände der Trennkammer werden mit lösungsmittelbefeuchtetem Filtrierpapier ausgekleidet. Man beschickt die Kammer 1 Std. vor dem ersten Lauf (Äquilibrierung der Kammeratmosphäre) mit 139 ml Lösungsmittel. Die Trennung wird abgebrochen, wenn die Lösungsmittelfront 1 cm vor dem oberen

Plattenrand steht, und man trocknet die Platte für 30 Min. bei 60° im Luftumwalzer. Dann wird bei unveränderten Bedingungen der zweite Trennungslauf durchgeführt. Danach trocknet man die Platte 5 Min. an der Luft vor und bringt sie anschliessend für 15 Std. zur völligen Trocknung in einen auf 11 mm Hg (Wasserstrahlpumpe) evakuierten Exsikkator über konzentrierte H₂SO₄ und frisches NaOH (in rotulis). (Für einen Exsikkator von 25 cm Durchmesser genügen 100 ml H₂SO₄ und 100 g NaOH.)

Anfärbung, Isolierung und Extraktion. Die getrockneten Platten werden kurz in eine 0.5 %ige Lösung (G/V) von Ninhydrin in Aceton getaucht und dann 105 Min. bei 70° in einem zuverlässig temperaturkonstanten Thermostat entwickelt. Die folgenden Arbeitsschritte sollen stets ohne Verzögerungen und in möglichst gleicher Zeit durchgeführt werden. Um die einzelnen Substanzflecke werden gleich grosse Areale markiert (z.B. mit einem sauberen Korkbohrer), die etwas grösser als die Farbflecke sein sollen.

Das Material innerhalb der Markierungen wird mit einem kleinen Spatel von der Platte gekratzt, auf einen glatten, gefalteten Papierbogen geklopft und von dort über einen kleinen Trichter in Glasröhrchen (7 cm lang, 4 mm Innendurchmesser) gefüllt. Bei sorgfältiger Arbeitsweise (Abklopfen einzelner, hangenbleibender Substanzpartikel) lässt sich die Substanz jedes Fleckens ohne Verlust in den Boden eines Röhrchens übertragen. In gleicher Weise werden in Höhe der einzelnen Substanzflecke 5 Blindproben aus der Platte entnommen. Anschliessend wird jedes Röhrchen mit 0.4 ml einer 0.5 %igen Lösung (G/V) von Cadmiumacetat in Methanol⁴ gefüllt und durch Einblasen von Luft mittels einer Glaskapillare die Substanz suspendiert (Vorsicht vor Überlaufen der Röhrchen). Man verschliesst die Röhrchen mit einem Plastikfilm (z.B. Para-film), suspendiert nach 2 Std. nochmals und zentrifugiert dann 10 Min. bei 3000 g. Bei vorsichtiger Handhabung kann man die überstehende Farblösung ohne Celluloseverunreinigungen abpipettieren und direkt in die Photometerkuvetten einfüllen.

Photometrische Messung. Zur photometrischen Auswertung der Substanzlosungen wurde mit einem Eppendorf-Photometer bei 494 m μ , Photozelle 90 b, mittlerer Blende, Halbmikroküvetten von 0.5 cm Schichtdicke gegen 0.5 %ige Methanol-Cd-Acetatlösung gemessen. Die einzelnen Messzahlen wurden gegen die jeweiligen Blindwerte korrigiert.

Ergebnisse und Diskussion

Fig. 1 zeigt die chromatographische Auftrennung des Substanzgemischs bei 0.5 bzw. 0.25 μ g pro Substanz, Fig. 2 die Extinktionskurven der fünf Substanzen für 2.5–0.25 μ g. Innerhalb dieses Bereichs verlaufen die Kurven streng linear. Bei höheren Substanzmengen liegen die Extinktionswerte im Vergleich zu den Standardmessungen relativ zu niedrig. Bei geringeren Mengen streuen besonders die Messwerte der Aminozucker beträchtlich. Die Messungen sind mit einem durchschnittlichen Fehler von $\pm 5\%$ der Werte reproduzierbar. Gelegentlich treten auch grösser Abweichungen auf, die wohl vor allem auf unregelmässige Temperaturschwankungen während der langen Entwicklungszeit der Ninhydrinfarbung zurückzuführen sind. (Kürzere Entwicklungszeiten sind zwar für die Aminosaurebestimmungen möglich, führen aber bei den Aminozuckern zu falschen Ergebnissen.) Es empfiehlt sich, eine Substanzbestimmung nicht einfach durch Vergleich mit einmal aufgestellten Standardkurven

vorzunehmen, sondern auch einige Werte der Eichsubstanzen nachzumessen, so dass eventuelle Abweichungen berücksichtigt werden können.

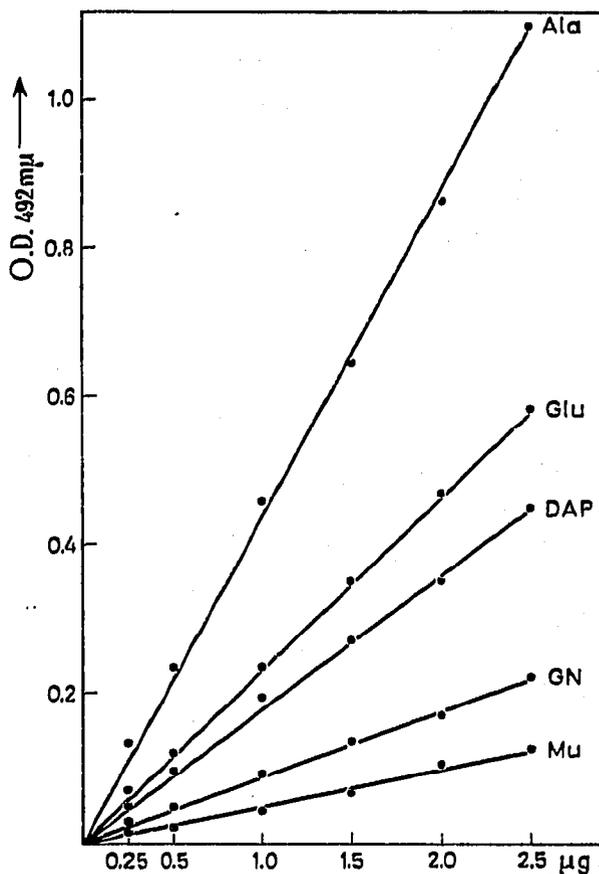
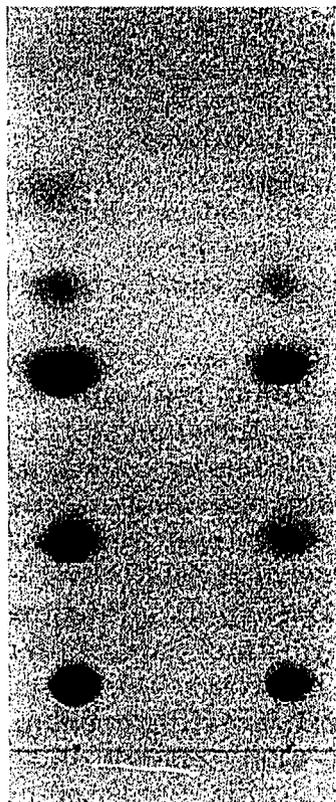


Fig. 1. Trennung von je 0.5 μg (links) und 0.25 μg (rechts) Substanz. Von oben nach unten: Muraminsäure, Glucosamin, Alanin, Glutaminsäure und DAP.

Fig. 2. Extinktionskurven für 2.5–0.25 μg Substanz. Mu = Muraminsäure; GN = Glucosamin; DAP = α - ϵ -Diaminopimelinsäure; Glu = Glutaminsäure; Ala = Alanin.

Dank

Die Arbeit wurde mit Unterstützung der Deutschen Forschungsgemeinschaft durchgeführt. Herrn Prof. Dr. W. WEIDEL danke ich für die Arbeitsmöglichkeit an seinem Institut, sowie für fruchtbare Diskussionen und Anregungen.

Max-Planck-Institut für Biologie, Abteilung Weidel, Tübingen
(Deutschland)

KLAUS ESSER*

- 1 W. WEIDEL UND H. PELZER, *Advan. Enzymol.*, 26 (1964) 193.
- 2 J. PRIMOSIGH, H. PELZER, D. MAASS UND W. WEIDEL, *Biochim. Biophys. Acta*, 46 (1961) 68.
- 3 R. E. STRANGE UND L. H. KENT, *Biochem. J.*, 71 (1959) 333.
- 4 J. HEILMANN, J. BAROLLIER UND E. WATZKE, *Z. Physiol. Chem.*, 309 (1957) 219.

Eingegangen den 24. September 1964

* Gegenwärtige Anschrift: Hygiene-Institut der Universität Marburg, Pilgrimstein 2, 355 Marburg/Lahn, Deutschland.