

Nachweis von Enzymen nach elektrophoretischer Trennung an Polyacrylamid-Säulchen

Seit der Entwicklung der disc-Elektrophorese an Polyacrylamid-Gelen durch ORNSTEIN¹ und DAVIS² hat diese Technik vielfältige Anwendung zur Trennung von Protein-Gemischen gefunden. Umso überraschender ist es, dass der Nachweis von Enzymen nur gelegentlich beschrieben ist. So gelang es z.B. ALLEN³ und ALLEN UND GOCKERMANN⁴ Phosphatase nachzuweisen.

Die Reihe der nachzuweisenden Enzyme an Polyacrylamid-Gel konnte von uns unter Verwendung bekannter Farbstoffe um Peroxydase, LDH und MDH erweitert werden.

Trennmethode

Der enzymatisch aktive Extrakt wird an 10%igem Acrylamid nach der Vorschrift von ORNSTEIN¹ und DAVIS² unter Verwendung von "spacer" und "sample" Gel getrennt. Die Trennung dauert bei 4° und einer Stromstärke von 2.5 mA/per Säulchen *ca.* 45 min. Der Trennvorgang wird beendet, sobald der als Markierung mitlaufende Farbstoff Bromphenolbläu das Gel verlässt. Sodann wird das Säulchen mittels eines scharfen Wasserstrahles durch eine Injektionskanüle von der Innenwand des Röhrchens gelöst und in ein weitulmigeres Glasröhrchen übertragen, das an der Innenseite an zahlreichen Stellen nadelförmig ausgezogen ist (Fig. 1). In diesem "blotched"

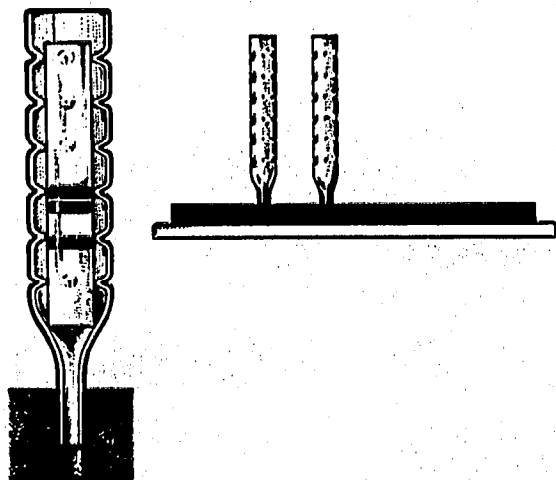


Fig. 1. Skizze eines "Pickel"-Röhrchen. Links: Längsschnitt, mit Polyacrylamid-Säulchen. Rechts: Aufstellung in einer Gummiplatte von 1 cm Dicke mit Bohrungen.

Röhrchen wird das hinderliche Ankleben an die Glaswand vermieden und eine allseitige Benetzung während der folgenden Operationen sichergestellt. Das "Pickel-Röhrchen" wird mit destilliertem Wasser gefüllt, in dem die Gel-Säulchen bei 4° bei einmaligem Wechsel eine Stunde verbleiben. Durch diese Wässerung wird erreicht, dass die nachfolgende Farbreaktion schneller eintritt und eine Untergrundfärbung unterbleibt.

Enzymnachweise

(a) *Peroxydase*. Der Nachweis erfolgt mit Benzidin-Guajakol⁵ bei Zimmertemperatur in 15–45 min. Es ist darauf zu achten, dass Tageslicht ferngehalten wird;

nur dann ist eine Untergrundfärbung zu verhindern. Das gewässerte Gel wird in eine stets frisch bereitete Lösung folgender Zusammensetzung gelegt:

- 2 ml Natriumacetat 0.2 M,
- 0.25 ml Benzidin-Guajakol-Lösung,
- 0.10 ml Mangansulphat 0.005 M,
- 0.10 ml Wasserstoffperoxyd-Lösung 0.12 %.

Die Benzidin-Guajakol-Lösung hat folgende Zusammensetzung:

- 50 mg Benzidin,
- 135 mg Guajakol,
- 25 ml Essigsäure p.a. 10 %ig.

Das Gemisch ergibt bei Erwärmen auf *ca.* 40° eine klare Lösung.

An der Oberfläche des Gel-Säulchens entsteht nach *ca.* 10 min an den Stellen von Peroxydase-Aktivität eine braunrote Färbung, welche nach *ca.* 30 min ihre maximale Farbtiefe erreicht (Fig. 2). Das Gel wird sodann aus der Substrat-Lösung herausgenommen, in destilliertem Wasser gespült, und in 2%iger Essigsäure bewahrt. Wird das Gel im Dunkeln aufbewahrt, so verändert sich die Farbintensität der Bänder innerhalb einer Woche nur geringfügig.

(b) *Milchsäure-Dehydrogenase (LDH)*. Das in dest. Wasser gespülte Gel wird bei einer Temperatur von 37° in die Inkubationsflüssigkeit gebracht. Diese hat fol-

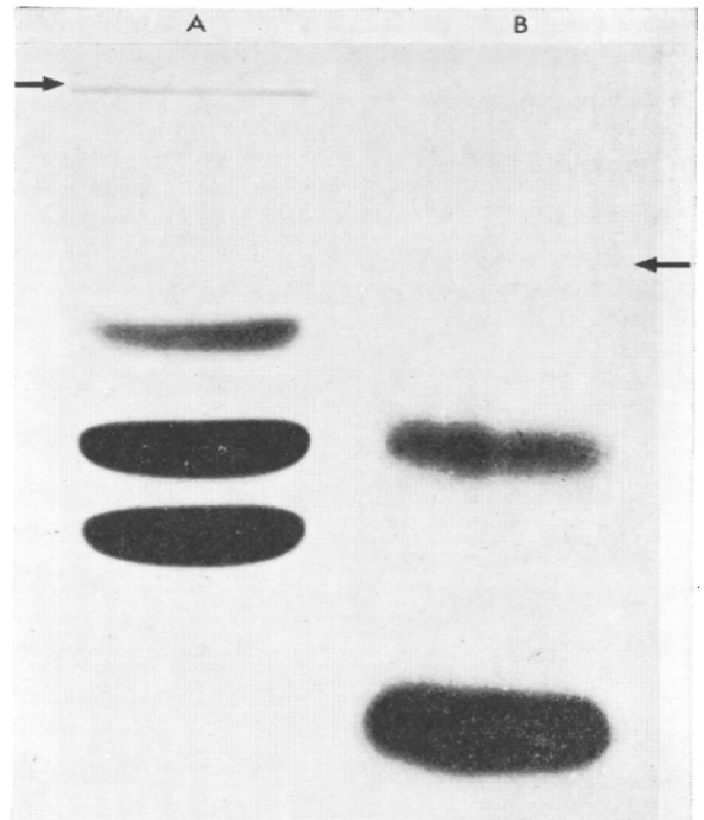
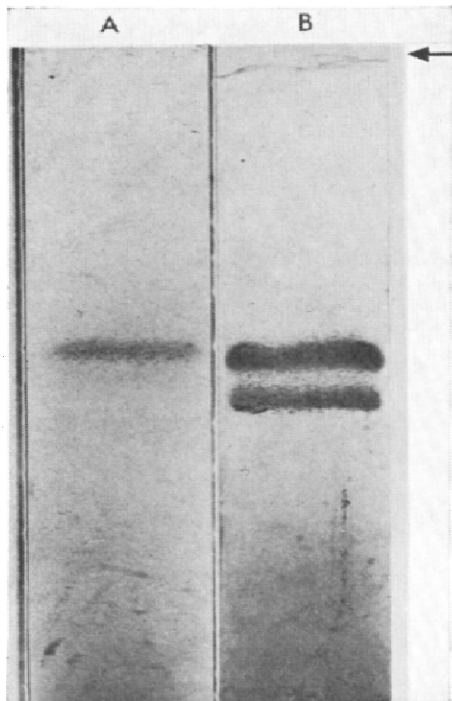


Fig. 2. Nachweis von Peroxydase (aus Meerrettich, Boehringer) an 7.5% Acrylamid. (A) 2 γ ; (B) 12 γ .

Fig. 3. Trennung eines identischen Blutserums und anschliessender LDH-Nachweis. (A) An 10% Acrylamid (6 μ l Serum); (B) an Agar (ausgeführt nach der Methode von VAN DER HELM *et al.* 1962 im Biochemischen Laboratorium der Klinik für Innere Medizin, Leiter: Dr. A. P. JANSEN).

gende Zusammensetzung (siehe VAN DER HELM *et al.*⁶): 7.2 ml Lösung I; 0.2 ml Lösung II; und 8 mg Nikotinamidadenindinukleotid (NAD); (pH 7.6).

Das Gemisch muss täglich frisch aus den folgenden Stamm-Lösungen bereitet werden:

Lösung I: 1 ml Natriumlaktat (70–72 %); 50 mg Natriumcyanid; 1.8690 g Dinatriumhydrogenphosphat ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$); 0.2722 g Kaliumdihydrogenphosphat (KH_2PO_4); und 25 mg Tetrazolium-Nitroblau (Nitro-BT). Diese Substanzen werden in dest. Wasser gelöst. Sodann wird auf 90 ml aufgefüllt und filtriert, wobei möglichst alles in Lösung gehen soll.

Lösung II: 10 mg Phenazinmethosulphat (PMS), gelöst in 10 ml dest. Wasser.

Die beiden Lösungen I und II sind mindestens 14 Tage haltbar, sofern sie vollständig dunkel bewahrt werden.

Die Farbentwicklung auf LDH ist bereits nach *ca.* 15 min zu sehen (Fig. 3). Inkubation bei 37° länger als 2 Stunden ist nachteilig. Gleiche Farbentwicklung wird bei Inkubation während der Nacht bei Zimmertemperatur erreicht, sofern diese im Dunkeln erfolgt.

Das Gel wird nach der Färbung aus der Inkubationsflüssigkeit genommen, in destilliertem Wasser gespült und in 2%iger Essigsäure bewahrt. Innerhalb einer Woche tritt keine Farbintensitätsänderung der Bänder auf.

Es muss darauf hingewiesen werden, dass die Trennung am Polyacrylamid nicht in allen Fällen das gleiche Verteilungsmuster liefert, wie eine Auftrennung mittels Agar-Elektrophorese (Fig. 3).

(c) *Apfelsäuredehydrogenase (MDH)*. Der Nachweis von MDH erfolgt analog der

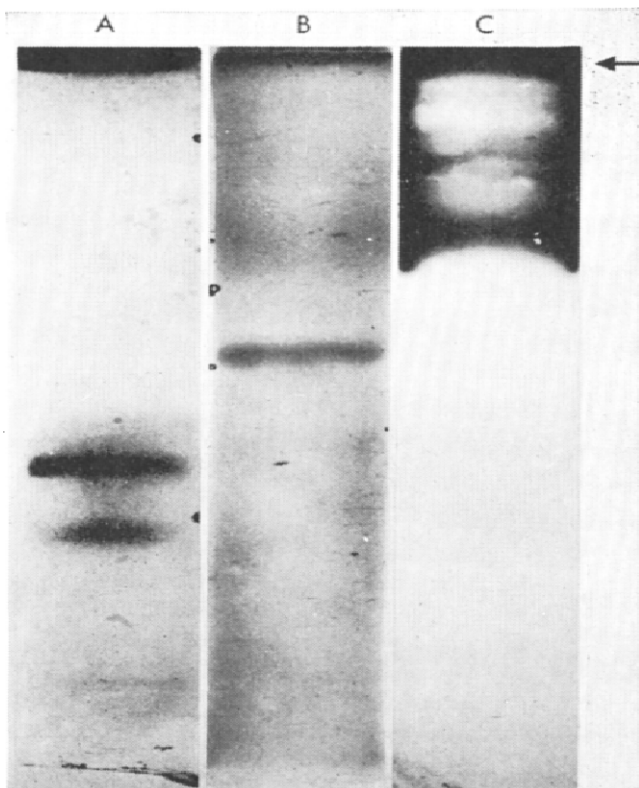


Fig. 4. Enzym-Trennung an 10% Acrylamid. Total-Extrakt des Tapetums von *Lilium henryi*, Tetraden-Stadium der Pollenmeiose. A = Peroxydase; B = LDH; C = MDH.

Vorschrift für LDH; an Stelle von 1 ml Natriumlaktat in der Lösung I wird 0.580 mg Apfelsäure, gelöst in 5 ml dest. Wasser und neutralisiert mit 0.1 N Natronlauge, zugefügt (Fig. 4).

Die Anwendung der genannten Farbreaktionen ergab bei Pflanzenextrakten (Fig. 4), die durch disc-Elektrophorese getrennt worden waren, scharfe und eindeutige Banden (LINSKENS⁷).

Dank

Für die Überlassung von LDH-Substrat danke ich Herrn Dr. A. P. JANSEN sehr.

Botanisches Institut der Universität Nijmegen (Die Niederlande)

J. SCHRAUWEN

1 L. ORNSTEIN, *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 121 (1964) 321.

2 B. J. DAVIS, *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 121 (1964) 404.

3 J. M. ALLEN, *J. Histochem. Cytochem.*, 11 (1963) 542.

4 J. ALLEN UND J. GOCKERMANN, *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 121 (1964) 616.

5 H. F. LINSKENS, in H. F. LINSKENS (Herausgeber), *Papierchromatographie in der Botanik*, 2. Aufl., Springer-Verlag, Berlin-Göttingen-Heidelberg, 1959, S. 183-184.

6 H. J. VAN DER HELM, H. A. ZONDAG, H. A. PH. HARTOG UND M. W. VAN DER KOOIJ, *Clin. Chim. Acta*, 7 (1962) 540.

7 H. F. LINSKENS, *Planta*, 69 (1966) 79.

Eingegangen den 26. November 1965

J. Chromatog., 23 (1966) 177-180

Separation of alcohol mixtures by thin-layer chromatography

Thin-layer chromatography (TLC) was applied by LAWSON AND GETZ¹ to the purification of selachyl alcohol and later by SUBBARAO *et al.*² to mixtures of alcohols, especially hydroxy-acids, employing petroleum ether-diethyl ether solvent systems. In the present study, ternary, quaternary and quinary artificial mixtures of alcohols were submitted to TLC resolution and the sequences of separation compared with the boiling points of the individual components.

Glass plates measuring 20 × 20 × 0.4 cm were cleaned with chromic acid and washed successively with tap and distilled water. The slurry of silica gel G was applied uniformly at a thickness of 0.25 mm. The coated plates were air-dried at 25° for 16 h, heated in an oven for 30 min at 110°, cooled and stored over silica gel. The alcohols of high purity originated from Union Carbide and Carbon Co., Stephan Chemical Co., Eastman Kodak Co., Armour and Co. and Air Reduction Chemical Co. The last source supplied 2-methyl-3-butyn-2-ol and 3-methyl-1-pentyn-3-ol, boiling at 103-104° and 120-121°, respectively.

A series of alcohol mixtures was prepared containing equivalent concentrations of each component and the total volume of the solutions was kept constant. The samples in amount of 5 μ l were applied with a microsyringe 2.0 cm from the lower edge of the plate and dried by air blower. Ascending development was affected at

J. Chromatog., 23 (1966) 180-182