

Nachweis von Cytochromoxydase mit Hilfe von Polyacrylamid-Electrophorese

Die Methode von ORNSTEIN und DAVIS^{4,7}, die sich zur Trennung von Proteingemischen vielfach bewährt hat, wurde in letzter Zeit auch zum Nachweis von Enzymen mit Erfolg angewendet^{1,2,3,8,9}. Unsere im folgenden beschriebene Methode ist ein qualitativer Nachweis von Cytochromoxydase. Bei den uns bekannten Methoden erfolgt der Enzymnachweis durch Anfärben der Gelsäulchen nach der Elektrophorese. Vorversuche hatten jedoch ergeben, dass eine Behandlung der Gelsäulchen nach der Elektrophorese mit der Inkubationslösung erfolglos war. Weder die kompakten Gelsäulchen noch in Längsschnitte zerteilte Säulchen zeigten irgendeine Reaktion. Darum bringen wir das Enzym bereits während der Elektrophorese mit der Inkubationslösung in Kontakt. Die anschliessende Behandlung mit Kobaltacetat-Acetatpuffer dient der Chelierung des Farbstoffes und damit der Intensivierung des Enzymbandes, das bereits nach Beendigung der Elektrophorese schwach sichtbar ist.

Folgende Arbeitsweise hat sich bewährt: Der Wasser-Anteil des "small-pore"-Gels ("spacer") wird durch das Inkubationsgemisch nach DUSPIVA⁵ ersetzt (15 mg *p*-Aminodiphenylamin + 15 mg 4-Methoxy-4'-aminodiphenylamin in 5 ml Äthanol + 35 ml Wasser + einige Tropfen Chloroform. Trübe Suspension schütteln und filtrieren!). Die restlichen Anteile des "small-pore"-Gels sind nach der Originalvorschrift von DAVIS⁴ so gewählt, dass der Acrylamid-Anteil 7.5 % beträgt. Als Träger-Gel ("sample") verwenden wir ebenfalls diese "small-pore" Lösung. Gegenüber "large-pore" als Träger-Gel erzielen wir damit einen gleichmässigeren Verlauf der Elektrophorese, eine "Schwanzbildung" bleibt aus und ausserdem verkürzt sich die Polymerisationszeit.

Die die Inkubationslösung enthaltenden "small-pore"-Säulchen polymerisieren bei 21°. Zum Zwecke einer schonenden Behandlung des Enzyms lassen wir das Träger-Gel bei 2° polymerisieren. Die Elektrophorese verläuft ebenfalls bei 2°, sie dauert etwa 35 min. Die Stromstärke beträgt 6 mA per Säulchen. Wir verwenden die Pufferlösung nach DAVIS⁴. Nach der Elektrophorese behandeln wir 10 min nach DUSPIVA⁵ mit Kobaltacetat-Formaldehyd-Acetatpuffer (5 g $\text{Co}(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$ in 50 ml 10%iger Formaldehydlösung + 5 ml Acetatpuffer, 0.2 M, pH 5.2). Anschliessend werden die Gelsäulchen 15 min unter fliessendem Leitungswasser differenziert. Die Cytochromoxydase-Bänder erscheinen undurchsichtig opaleszent auf schwach rot gefärbtem Hintergrund.

Fig. 1 zeigt 3 Beispiele von Cytochromoxydase-Bändern: (A) aus Rinderherzmuskel; (B) aus Augen von *Drosophila melanogaster*, Wildform; (C) aus Augen von *Drosophila melanogaster*, Mutante "brown".

Die Cytochromoxydase aus den Mitochondrien von Rinderherzmuskel (A) wurde nach FOWLER, RICHARDSON AND HATEFI⁶ dargestellt. Sie diente als Vergleichssubstanz für gereinigte Proteinfractionen aus Mitochondrien von *Drosophila melanogaster* (B und C). Cytochrom-c, Cytochromoxydoreductase und Succinindehydrogenase lieferten mit der beschriebenen Methode keine Bänder. Um gut sichtbare Bänder zu erhalten, darf ein Gehalt von 1.5 mg/ml Protein des gereinigten Extraktes nicht unterschritten werden. Wir haben im Mittel 30 γ à 50 γ Protein aufgebracht.

Bei Reihenuntersuchungen mit verschiedenen *Drosophila* Mutanten hat sich diese qualitative Methode als geeignet erwiesen.

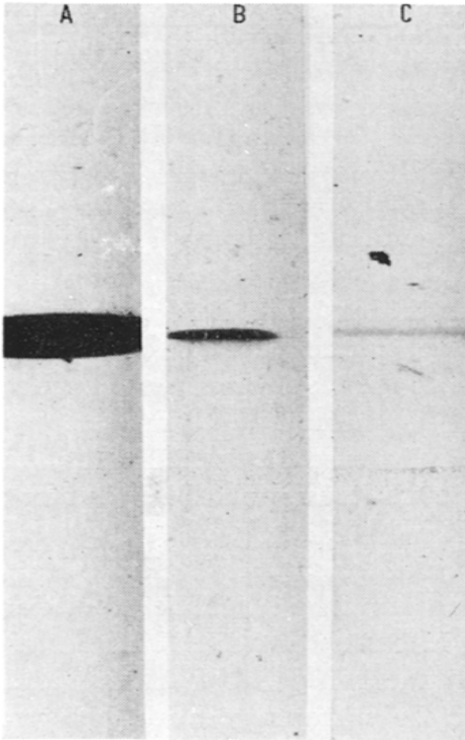


Fig. 1. Cytochromoxydasebänder von: (A) Rinderherzmuskel; (B) Augen von *Drosophila melanogaster*, Wildtyp; (C) Augen von *Drosophila melanogaster*, Mutante "brown".

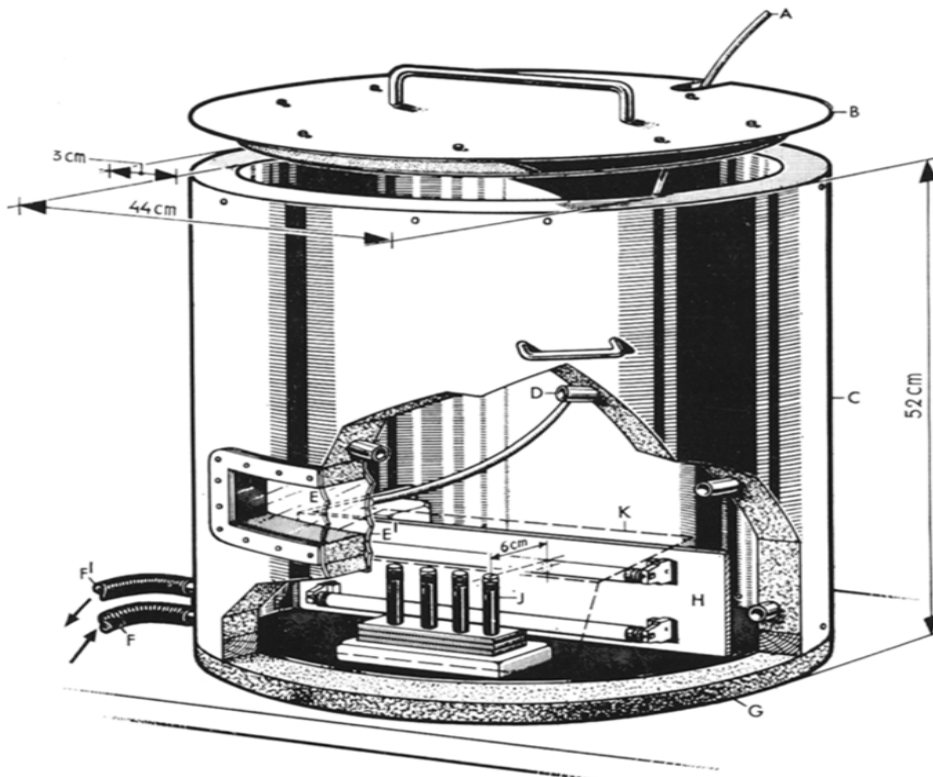


Fig. 2. "Kühlzylinder" während der Polymerisation von Träger-Gel. A = Kabelanschluss für die Leuchtstoffröhren H; B = Deckel (mit Tempex isoliert); C = Mantel; D = Kühlspirale; E-E' = Beobachtungsfenster; F-F' = Schlauchanschlüsse für den Umlaufthermostat; G = Boden (mit Tempex isoliert); J = Gelsäulchen; K = Lichtschirm (Blatt weisses Papier).

Zur Einhaltung der niedrigen Arbeitstemperatur wird ein "Kühlzylinder" benutzt, der an einen Umlaufthermostaten (Kryothermat KT62, Haake, Berlin) angeschlossen ist.

Unser "Kühlzylinder" besteht im Wesentlichen aus einem doppelwandigen Metallmantel, in dessen Innern eine Kühlspirale aus dünnem Kupferrohr verläuft. Ein Fenster erleichtert die visuelle Kontrolle. Für Kabelanschlüsse ist im Deckel eine kleine Öffnung ausgespart. In Fig. 2 wird die Polymerisierung des "sample" dargestellt.

Während der Elektrophorese enthält der "Kühlzylinder" die beiden Puffer-Reservoirs mit den dazwischen befindlichen Polyacrylamidsäulchen. Ein Temperaturgradient von $\pm 2^\circ$ im Innern des "Kühlzylinders" (vom Deckel bis zum Boden) stört den Versuchsablauf nicht. Als Kühlflüssigkeit dient Methanol.

Die Kombination "Kühlzylinder"-"Kryothermat" ersetzt den üblichen Kühlraum und hat ausserdem noch den Vorteil, dass sie als transportables System dicht beim Arbeitsplatz aufgestellt werden kann.

Frl. A. H. M. VAN DER LOO danke ich sehr herzlich für ihre Mitarbeit bei der Ausführung der Experimente. Den Herren J. G. M. VAN LANGEN und R. J. C. SCHAPERS sei für die Ausführung des Kühlzylinders und den Herren J. GERRITSEN und TH. G. H. LAMMERS für die Anfertigung der technischen Zeichnung gedankt. Herrn DR. H. J. SCHUURMANS STEKHOVEN sei für die Überlassung der Mitochondrienfraktion aus Rinderherzmuskel gedankt.

*Genetisches Institut der Universität Nijmegen
(Die Niederlande)**

B. STUMM-TEGETHOFF

- 1 J. M. ALLEN, *J. Histochem. Cytochem.*, 11 (1963) 542.
- 2 J. ALLEN UND J. GOCKERMANN, *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 121 (1964) 616.
- 3 J. B. BOYD UND H. K. MITCHELL, *Anal. Biochem.*, 13 (1965) 28.
- 4 B. J. DAVIS, *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 121 (1964) 404.
- 5 F. DUSPIVA, in H. U. BERGMAYER (Herausgeber), *Methoden der enzymatischen Analyse*, Verlag Chemie, Weinheim/Bergstr., 1962.
- 6 L. R. FOWLER, S. H. RICHARDSON UND Y. HATEFI, *Biochim. Biophys. Acta*, 64 (1962) 170.
- 7 L. ORNSTEIN, *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 121 (1964) 321.
- 8 J. SCHRAUWEN, *J. Chromatog.*, 23 (1966) 177.
- 9 K. TAKAYAMA, D. H. MACLENNAN, A. TZAGOLOFF UND C. D. STONER, *Arch. Biochem. Biophys.*, 114 (1966) 223.

Eingegangen den 12. April 1967

* Direktor: Prof. Dr. S. J. GEERTS.

J. Chromatog., 30 (1967) 284-286