

CHROM. 4650

Dünnschichtchromatographische Direktmethode zum Nachweis von Enzymwirkungen

Durch das Prinzip der direkten Inkubation von Enzymlösung und Substratlösung auf der Dünnschichtplatte mit nachfolgender chromatographischer Analyse wird eine gleichzeitige Untersuchung sehr geringer Mengen biologischen Materials auf verschiedene Enzymwirkungen hin ermöglicht. Diese Methodik kann deshalb leicht Verwendung finden zur enzymatischen Untersuchung von jeglichen Punktionsmaterial tierischer oder pflanzlicher Herkunft mit einem Eiweißgehalt von nur $10\text{--}20\ \mu\text{g}$.

Die einfache Methodik besteht darin, dass 0.001 bis $0.002\ \text{ml}$ der jeweils vorgesehenen Substratpufferlösung (entsprechend 10^{-7} bis 10^{-8} Mol Substrat) von einem bestimmten pH mit $0.001\ \text{ml}$ der auf enzymatische Aktivität hin zu untersuchende Flüssigkeit oder Extrakt direkt auf die markierten Startstellen einer entsprechend beschichteten Dünnschichtplatte aufgetragen wird. Die Auftragungen zu Beginn der enzymatischen Reaktion, also bei t_0 , werden mit einem Föhn sofort abgetrocknet und diejenigen Auftragungen, welche den verschiedenen Inkubationszeiten entsprechen, werden für deren Dauer feucht gehalten. Dies geschieht durch Umdrehen der Dünnschichtplatte, sodass die Auftragsflächen, die somit den Inkubaten entsprechen, über eine mit Wasser gefüllte schmale Glaswanne im Brutschrank bei der gewünschten Temperatur (z.B. 37°) feucht gehalten werden können. Dabei ist es unbedingt notwendig, dass die Dünnschichtplatte auf den Rändern der Glaswanne dicht aufliegt, damit die Sättigung des Zwischenraumes Wasserfläche-Inkubationsflächen mit Wasserdampf gewährleistet bleibt (siehe Fig. 1).

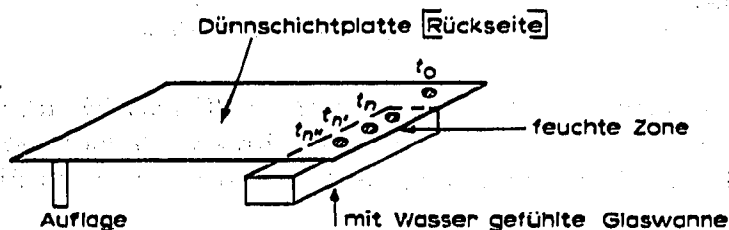


Fig. 1. Schematische Darstellung der Versuchsanordnung für die dünnschichtchromatographische Direktmethode. t_0 = Auftragung (Inkubation) zu Beginn der enzymatischen Reaktion; t_n , t_n' und t_n'' = Auftragungen (Inkubate) für verschiedene Reaktionszeiten.

Unterschiedliche Inkubationszeiten lassen sich durch einfaches Verschieben der Dünnschichtplatte über der Glaswanne erreichen, sodass das betreffende Inkubate, dessen Zeit abgelaufen ist, in den wasserdampffreien Raum des Brutschanks gelangt. Durch das sofortige Eintrocknen der Auftragung (Inkubation) wird die Enzymwirkung abgestoppt. Nach Ablauf der letzten Inkubation wird in der üblichen Weise chromatographiert und das erhaltene Chromatogramm kann qualitativ und quantitativ ausgewertet werden.

Als Beispiel für die beschriebene Methode wird der Nachweis der peptidatischen Wirkung des menschlichen Placentaextraktes gegenüber den D- und L-Isomeren von Leucylglycin und Leucylglycylglycin geführt. Hierbei wurden zur Analyse $0.001\ \text{ml}$

wässriger Placentaextrakt (Eiweissgehalt $40 \mu\text{g}$) und 0.002 ml Substratlösung ($4.6 \times 10^{-8} \text{ Mol}$ in Trispuffer pH 7.2) auf den Auftragsstellen einer Kieselgel-G-Platte für die Dauer von 4 Std. bei 37° inkubiert. Die anschliessende chromatographische Trennung wurde im Fließmittelsystem *n*-Butanol-Essigsäure-Wasser (8:2:2)¹ durchgeführt und die Anfärbung der Peptide und Aminosäuren wurde durch Besprühen mit Ninhydrinlösung² vorgenommen.

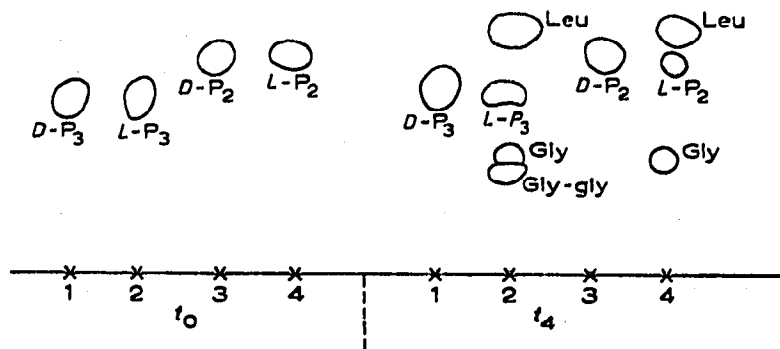


Fig. 2. Dünnschichtchromatogramm von Inkubationen des wässrigen Placentaextraktes mit D-Leu-gly-gly (1), L-Leu-gly-gly (2), D-Leu-gly (3) und mit L-Leu-gly (4) bei pH 7.2 und bei 37° . t_0 = Beginn der Inkubation; t_4 = nach vierstündiger Inkubation. D-P₃ = D-Leu-gly-gly; L-P₃ = L-Leu-gly-gly; D-P₂ = D-Leu-gly; L-P₂ = L-Leu-gly. Sorptionsmittel: Kieselgel G. Fließmittel: *n*-Butanol-Essigsäure-Wasser (8:2:2). Nachweis: Ninhydrin.

Das abgebildete Dünnschichtchromatogramm (Fig. 2) lässt eindeutig erkennen, dass nach vierstündiger Inkubationszeit nur die L-Peptide und nicht die isomeren D-Peptide hydrolysiert wurden. Ebenso ist an Hand der bei Zeit t_4 gebildeten Aminosäuren- bzw. Peptidflecken (Leu; Gly-gly (gelbe Färbung); Gly (orange Färbung)) zu ersehen, dass, wie bereits bekannt³, der peptidatische Abbau von L-Leucyl-glycyl-glycin durch Placentaextrakt über die primäre Abspaltung des Leucins verläuft, wobei das dabei intermediär gebildete Gly-gly durch nachfolgende Hydrolyse weiter zu Glycin aufgespalten wird.

Durch photometrische Bestimmung der gebildeten Aminosäureflecken bzw. ihrer Cu-Komplexe kann die enzymatische Peptidspaltung auch quantitativ verfolgt werden.

Institut für Physiologische Chemie der Universität des Saarlandes,
Homburg/Saar (B.R.D.)

E. ZOCH

1 K. RANDERATH, *Dünnschicht-Chromatographie*, Verlag Chemie, Weinheim/Bergstr., 1965, S. 114.

2 F. CRAMER, *Papierchromatographie*, Verlag Chemie, Weinheim/Bergstr., 1953, S. 55.

3 E. ZOCH, *Enzymologia*, 28 (1965) 325.

Eingegangen am 23. Januar 1970