

EIN BEITRAG ZUR SCHNELLEN QUANTITATIVEN BESTIMMUNG VON ATP, ADP UND AMP IN GRÜNEN PFLANZENORGANEN

F. FRIC und A. HASPELOVÁ-HORVATOVICOVÁ

Botanisches Institut der Slowakischen Akademie der Wissenschaften, Abteilung für
pathologische Physiologie, Bratislava, Dúbravská 26, Tschechoslowakei

(Received 7 September 1966)

Zusammenfassung—Es wird eine Schnellmethode zur quantitativen Bestimmung von ATP, ADP und AMP in grünen Pflanzenmaterial mit Hilfe einer Enzymtestkombination der Fa. C. F. Boehringer und Soehne beschrieben.

Abstract—A rapid quantitative determination of ATP, ADP and AMP in green plant material is described. A commercially available enzyme was used in the experiments.

EINLEITUNG

DIE wichtige Rolle, die zahlreiche Nucleotide in der Zelle spielen, führte zur Entwicklung mehrerer Bestimmungsmethoden, besonders in tierischem Material. Obwohl diese Methoden für tierisches Material genügend durchgearbeitet sind, erwiesen sie sich bei der Anwendung auf Pflanzenmaterial als ungeeignet. Die quantitative Nucleotid-Bestimmung in Pflanzenmaterial stößt auf größere experimentelle Schwierigkeiten, die sich einerseits aus dem niedrigen Nucleotid-Gehalt in den Pflanzengeweben und andererseits aus der Anwesenheit zahlreicher störender Stoffe, besonders von Pigmenten, ergeben. Die Entfernung der Pigmente aus den Proben war bis vor kurzem ein schwieriges Problem. Deshalb beschäftigten sich auch die meisten Arbeiten ausschließlich mit Nucleotidbestimmungen (vor allem ATP) in nicht grünen Pflanzenteilen.¹⁻³ In älteren Arbeiten wurde ATP in grünen Pflanzen lediglich als Orthophosphat nach saurer Hydrolyse bestimmt⁴ oder aber viskosimetrisch⁵ oder chromatographisch.⁶

Diese Arbeit ist ein Beitrag zur Schnellbestimmung von ATP, ADP und AMP in grünen Pflanzenorganen.

PRINZIP DER METHODE

Das Pflanzenmaterial wird mit 5% HClO₄ bei einer Temperatur von 1–2° homogenisiert. Die denaturierten Pigmente werden mit Hilfe eines stark basischen Anionenaustauschers oder stark sauren Kationenaustauschers entfernt. Die Nucleotide werden vom Austauscher mit Ammoniumformiat eluiert, aus dem Eluat an Aktivkohle adsorbiert und von der Kohle

¹ K. S. ROWAN, D. E. SEAMAN und J. S. TURNER, *Nature* **177**, 333 (1956).

² J. WEIGL, *Planta* **60**, 307 (1963).

³ M. KLUGE und H. ZIEGLER, *Planta* **61**, 167 (1964).

⁴ B. I. POZSÁR und Z. KIRÁLY, *Nature* **182**, 1686 (1958).

⁵ K. ŠEBESTA und F. ŠORM, *Chem. Listy* **48**, 1585 (1954).

⁶ W. SIMONIS und L. SCHWINCK, *Naturwissenschaften* **40**, 245 (1953).

durch ein entsprechendes Elutionsmittel eluiert, das im Vakuum bei 28–30° bis zur Trockne eingeengt wird. In der wäßrigen Lösung des trockenen Rückstandes werden ATP, ADP und AMP mit Hilfe einer Enzymtestkombination bestimmt.

AUFGARBEITUNG DES PFLANZENMATERIALS

Das frische Pflanzenmaterial (*ca.* 3 g) wird mit 10 ml 5% HClO₄ bei 1–2° homogenisiert. Das Homogenat wird bei 26,000 g abzentrifugiert, das Sediment 3 mal mit je 10 ml 5% HClO₄ extrahiert. Die vereinigten Extrakte werden zur Daenturierung der Pigmente—besonders der Chlorophylle—in saurem Milieu *ca.* 15 Minuten stehengelassen. Der pH-Wert des Extraktions wird dann mit KOH auf 6 bis 6,5 eingestellt, KClO₄ wird abzentrifugiert. Der Überstand wird zur Entfernung von Substanzen—vor allem der denaturierten Pigmente, die die spektrophotometrische Bestimmung stören, bei 18–20° weiterverarbeitet. Dazu eigneten sich am besten stark basische, weniger gut stark saure Ionenaustauscher.

1. Entfernung von Störstoffen durch einen stark sauren Kationenaustauscher

Der Nucleotid-haltige Überstand wird auf eine Ionenaustauscher-Säule von Dowex 50 W × 4, 100–200 mesh, NH₄-Form (14 cm × 1 cm²) aufgetragen (Durchflußgeschwindigkeit 2 ml/Min). Ein großer Teil der denaturierten Pigmente wird am Austauscher festgehalten. Von den Nucleotiden wird besonders ein Teil des ATP durch seine Aminogruppe festgehalten, die unterhalb von pH 5,8 schon teilweise ionisiert ist. Die Nucleotide werden von der Säule mit 30 ml Pufferlösung (0,8 M HCOONH₄, pH 6,5) eluiert. Störende Substanzen, besonders HCOONH₄ werden durch Adsorption der Nucleotide an Aktivkohle entfernt.

2. Entfernung von Störstoffen durch einen stark basischen Anionenaustauscher

Der Nucleotid-haltige Überstand wird auf eine Säule von Dowex 1 × 4, 100–200 Mesh, Formiat-Form (10 cm × 1 cm²) aufgetragen (Durchflußgeschwindigkeit 2 ml/Min). Sowohl die Nucleotide als auch die denaturierten Pigmente werden quantitativ gebunden. Die übrigen Ballaststoffe werden mit 20–30 ml kaltem Wasser ausgewaschen. Die Nucleotide werden quantitativ mit einer gepufferten Lösung von 2 M HCOONH₄, pH 6,5, eluiert.

3. Adsorption an Aktivkohle

Zur Trennung der Nucleotide von störenden Stoffen, besonders von Salzen nach chromatographischer Trennung an Ionenaustauschern wird mit Erfolg Aktivkohle verwendet. Dieses Verfahren ist aber mit gewissen Verlusten verbunden. Die Möglichkeiten einer quantitativen, reproduzierbaren Bestimmung müssen für jede verwendete Aktivkohle überprüft werden. Wir untersuchten deshalb die Bedingungen der quantitativen Adsorption und Desorption besonders von ATP, ADP und AMP an drei handelsüblichen Aktivkohlepräparaten:

- (1) Norit A der Fa. N. V. Norit Verkoop Centrale-Amsterdam, Holland;
- (2) Norit A der Fa. Serva Entwicklungslabor-Heidelberg, Deutschland;
- (3) Karborafin der Fa. Lachema VEB, Brno, Tschechoslowakei.

Vor der Verwendung reinigten wir die Aktivkohle durch Abkochen mit verdünnter Salzsäure (2 N) und nach Dekantierung mit Wasser, und dann durch Abkochen mit verdünntem Ammoniak (2 N). Nach abermaliger gründlicher Dekantierung wurde sie bei 105° getrocknet.

Neben der Adsorption von ATP, ADP und AMP untersuchten wir auch die Adsorption anderer Nukleotide und Purin- oder Pyrimidinbasen (je 1 μMol) an verschiedene Mengen Aktivkohle in Gegenwart von Säuren oder Salzen (1 μMol Substanz + Aktivkohle + 4 ml 5% HClO_4). Die Mischungen wurden 10 Min lang bei einer Temperatur von 1–2° geschüttelt. Die nichtadsorbierten Reste bestimmten wir spektrophotometrisch durch Messung der Absorption im U.V.⁷ ATP, ADP und AMP bestimmten wir auch mit Hilfe von Enzymtests.

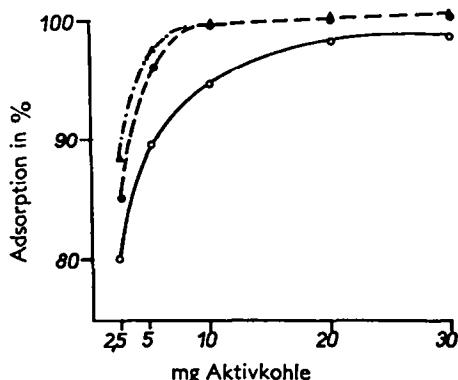


ABB. 1. ADSORPTION VON ADENIN AN AKTIVKOHLE IN ABHÄNGIGKEIT VON DER KOHLEMENGE IN HClO_4 -LÖSUNG. ALLE WERTE SIND DURCHSCHNITTSWERTE VON 4 BESTIMMUNGEN (1/ μMOL ADENIN; KOHLE, 4 ML 5% HClO_4 ; DIE MISCHUNG WIRD 10 MIN LANG BEI 1–2° GERÜHRT).

— Karborafin; - - - Norit A (Serva); - - - Norit A (Norit Verkoop Centrale).

Der Verlauf der Adsorption von Adenosin und Uracil entspricht unter denselben Bedingungen dem von Adenin. Auch der Verlauf der Adsorption von Cytosin, Cytidin, Guanin und Guanosin ist ähnlich.

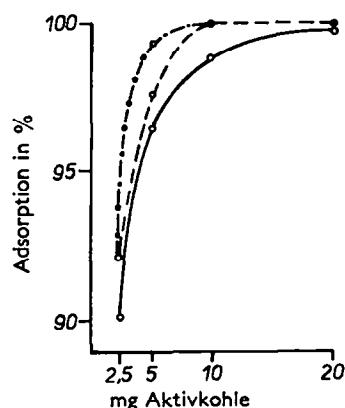


ABB. 2. ADSORPTION VON ATP AN AKTIVKOHLE IN ABHÄNGIGKEIT VON DER KOHLEMENGE IN HClO_4 -LÖSUNG.

Versuchsbedingungen und Erklärungen wie auf Abb. 1. Der Verlauf der Adsorption von ADP und AMP entspricht der von ATP.

⁷ E. VISCHER und E. CHARGRAFF, *J. Biol. Chem.* 176, 703 (1948).

Es zeigte sich, daß die Adsorption von Nukleotiden, Nukleosiden und auch Purin- und Pyrimidinbasen in saurem Milieu (5% HClO_4 ; 5% trichloressigsäure) oder auch in einer Lösung von 2 M HCOONH_4 beim jeweiligen Handelspräparat von Aktivkohle praktisch gleich ist. Eine Verlängerung der Schüttelzeit von 10 auf 30 Min erhöhte den Prozentsatz der Adsorption nicht.

Aus Abb. 1 und 2 ist ersichtlich, daß die Aktivkohle des Typus Norit A im Vergleich mit Karborafin sehr aktiv ist, was sich andererseits aber bei der Elution ungünstig auswirkt.

Von Karborafin mußte zur Erlangung der gleichen Ergebnisse im Vergleich zu den Noriten ungefähr die doppelte Menge eingesetzt werden.

Von diesen Erfahrungen ausgehend (Abb. 1 u. 2) verwendeten wir für die Adsorption von ungefähr 1 μMol Substanz 20 mg Karborafin. Um die vollständige Adsorption auch von Spuren von ATP, ADP und AMP sowie auch der übrigen Nukleotide und Basen zu erreichen, führten wir die Adsorption 2 mal nacheinander an je 10 mg Aktivkohle durch.

TABELLE 1. VERLUSTE AN ATP, ADP UND AMP BEI DER AUFARBEITUNG MIT NORIT A

Aktivkohle	Elutionslösung und Anzahl der Elutionen je 5 ml	Verluste an Nucleotiden (von 1 μMol) bei der Aufarbeitung mit 20 mg Aktivkohle in %*		
		ATP	AMP	ADP
Norit A (Serva)	96% Äthanol-Pyridin-25% Ammoniak-Wasser (50:5:4:41 Vol.) 6 x eluiert	47	27	39
	96% Äthanol-25% Ammoniak-Wasser (50:0,5:49,5 Vol.) 3 x eluiert Aceton-25% Ammoniak-Wasser (40:0,5:49,5 Vol.) 3 x eluiert	28	21	24
	96% Äthanol-25% Ammoniak-Wasser (25:2:73 Vol.) 6 x eluiert	23	18	20
Norit A (N. V. Norit, Verkoop Centrale)	96% Äthanol-Pyridin-25% Ammoniak-Wasser (50:4:41 Vol.) 6 x eluiert	45	43	34
	96% Äthanol-25% Ammoniak-Wasser (50:0,5:49,5 Vol.) 3 x eluiert Aceton-25% Ammoniak-Wasser (40:0,5:49,5 Vol.) 3 x eluiert	28	19	19
	96% Äthanol-25% Ammoniak-Wasser (25:2:73 Vol.) 6 x eluiert	18	17	18

* Die Ergebnisse sind das arithmetische Mittel aus vier Bestimmungen und sind mit $\pm 1,5\%$ Genauigkeit reproduzierbar.

Die adsorbierten Stoffe desorbierten wir von der Aktivkohle mit verschiedenen Elutionsmitteln, die je nach der Art der Kohle verschieden aktiv waren (Abb. 3 u. 4 und Tabelle 1). Aus Abb. 3 ist ersichtlich, daß sich von Karborafin Adenin am besten durch eine alkoholische Pyridinlösung in Gegenwart von Ammoniak desorbiert (96% Äthanol:Pyridin:25% Ammoniak:Wasser = 50:5:4:41, Abb. 3). Dies gilt auch für AMP, ADP und ATP und die übrigen untersuchten Substanzen. Bei Verwendung von Norit A erzielten wir die besten Ergebnisse mit einer verdünnten Ammoniaklösung (96% Äthanol:25% Ammoniak:Wasser = 25:2:73 Vol., Tabelle 1). Es traten zwar bedeutende Verluste besonders von ATP auf (Abb. 4, Tabelle 1), die Ergebnisse waren aber in jedem Falle gut reproduzierbar. Deshalb verwendeten wir für unsere weiteren Analysen ausschließlich Karborafin. Außerdem untersuchten wir den Einfluß der Karborafin-Menge auf die Ausbeute und fanden unter sonst gleichen Bedingungen selbst bei 10 facher Karborafin-Menge den Prozentsatz der Ausbeute an ATP, ADP und AMP nicht beeinflußt (Abb. 5).

Bei der Analyse von Pflanzenmaterial verwendeten wir pro 1 g Frischgewicht 25 mg Karborafin, das wir 2 mal zu je ca. 12 mg einsetzten. Nach Adsorption der Nukleotide auf den ersten Teil von Karborafin wurde die Aktivkohle auf einer kleinen Celit-Säule (1 cm Schicht) aufgefangen und das Filtrat ein weiteres Mal mit Aktivkohle behandelt. Nach Dekantierung der Säule mit Eiswasser desorbierten wir die Substanzen 7 mal mit je 5 ml Elutionslösung (96% Äthanol:Pyridin:25% Ammoniak-50:5:4:41 Vol.). Das Eluat dampften wir in einem Rotationsverdampfer bei 28–30° bis zur Trockne ein. Den Rest verwendeten wir nach Auflösen in H₂O (0,2–0,3 ml pro 1 g Frischgewicht des Pflanzenmaterials) zur enzymatischen Bestimmung von AMP, ADP und ATP.

ENZYMATISCHE BESTIMMUNG VON ATP, ADP UND AMP

Die Nucleotide wurden mit Hilfe der Enzymtestkombination der Fa. Behringer und Soehne GmbH Mannheim bestimmt (Adenosin-5'-Triphosphat U.V. Test TC-Y; Adenosin-5'-Diphosphat und Adenosin-5'-Monophosphat U.V. Test TC-K).

Die Bestimmungen von ATP führten wir nach den älteren Anleitungen des Herstellers durch: 2,4 ml der Lösung [1]; 0,04 ml NADH [2]; 0,2 ml Probe; 0,04 Enzymatische Suspension [3]. Von frischer NADH-Lösung setzten wir nur 0,02 ml ein, damit die Extinktion der zu messenden Lösung nicht zu hoch wurde.

Bei der Bestimmung von ADP und AMP hielten wir das Arbeitsverfahren mit den entsprechenden Konzentrationen der einzelnen Komponenten ein, lediglich die Volumina paßten wir unseren Verhältnissen an. Den Inhalt des Fläschchens [1] mit dem Triäthanolaminpuffer lösten wir in ungefähr 20 ml bidestillierten Wassers auf und stellten mit verdünnter HClO₄ den pH-Wert auf ungefähr 7,5 ein, um K₂CO₃ aus der Lösung zu entfernen, was bei Blutanalysen zur Neutralisierung der überschüssigen Perchlorsäure nach Entfernung der Eiweiße dient. Nach dem Abzentrifugieren von KClO₄ füllten wir die Lösung auf 100 ml auf und verwendeten sie zu den Analysen.

Anstelle des so aufgearbeiteten vom Hersteller gelieferten "Puffers" kann man auch direkt 0,1 M Triäthanolaminpuffer von pH 7,5 verwenden. Anstelle von 0,1 ml 9·10⁻³ M NADH pipettieren wir 0,02 bis 0,04 ml 1,2·10⁻² M NADH hinzu, also die NADH-Lösung, die bei der Bestimmung von ATP verwendet wird. Der Ansatz zur ADP/AMP-Bestimmung hatte folgende Zusammensetzung.: 2,0 ml Pufferlösung [1]; 0,15 ml Lösung [2]; 0,04 ml NADH-Lösung [3]; 0,2 ml Probe; 0,02 ml Suspension [4]; 0,02 ml Suspension [5].

Alle Messungen führten wir am Zeisschen Universalspektrophotometer VSU 1 bei einer Wellenlänge von 340 nm durch.

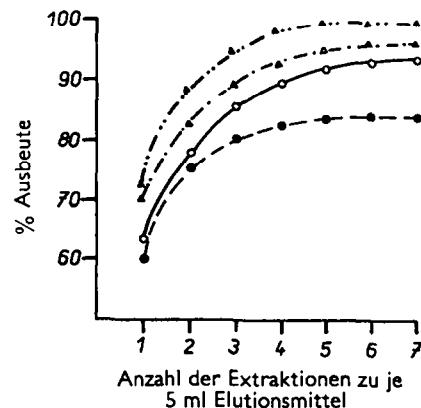


ABB. 3. DESORPTION VON $1/\mu\text{MOL}$ ADENIN VON 20 MG KARBORAFIN DURCH VERSCHIEDENE ELUTIONSMITTEL.

..... Lösung aus 96% Äthanol, Pyridin, 25% Ammoniak und Wasser (50:5:4:40 Vol.); ----- 96% Äthanol, Benzin, Wasser (60:2:38 Vol.); —— 96% Äthanol, 25% Ammoniak, Wasser (50:1:49 Vol.); - - - Aceton, 25% Ammoniak, Wasser (60:1:39 Vol.)

Die Desorption der übrigen Nukleoside und Basen durch die angeführten Elutionslösungen hatte einen ähnlichen Verlauf.

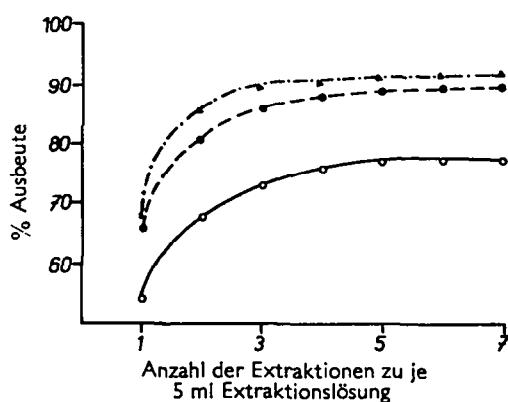


ABB. 4. DESORPTION VON $0,2/\mu\text{MOL}$ NUKLEOTIDE AUS 20 MG KARBORAFIN DURCH EINE LÖSUNG VON 96% ÄTHANOL, PYRIDIN, 25% AMMONIAK UND WASSER (50:5:4:40).
----- AMP; - - - ADP; —— ATP.

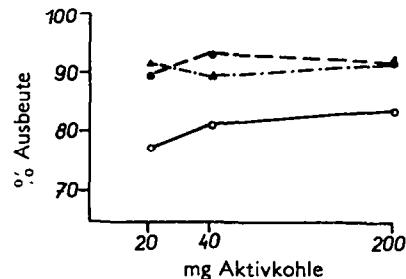


ABB. 5. DESORPTION VON $0,2/\mu\text{MOL}$ VON NUKLEOTIDEN DURCH EINE LÖSUNG VON 96% ÄTHANOL, PYRIDIN, 25% AMMONIAK UND WASSER (50:5:4:40) VON KARBORAFIN IN ABHÄNGIGKEIT VON DER KOHLEMENGE.
----- AMP; - - - ADP; —— AMP.

Durch Zugabe von Spuren von Kaliumdichromat in die Vergleichsküvette brachten wir die Extinktion der Messküvette in einen günstigen Messbereich. Nachdem die O-Extinktion in Abständen von je einer Minute dreimal abgelesen worden war, setzten wir das Enzympräparat hinzu und beobachteten das Absinken der Extinktion E über 5-7 Min. E wird dann durch Extrapolation des linearen Astes der Extinktionskurve auf den Zeitpunkt der Enzymzugabe festgestellt (näherte Angaben siehe⁸). Auf diese Weise können unspezifische Herabsetzungen der Extinktion, die manchmal vorkommen, ausgeschaltet werden. Die Berechnung führten wir mit Hilfe der in der Arbeitsanleitung angegebenen Faktoren durch.

ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Die Verluste, die bei der Bestimmung von ATP, ADP und AMP nach dem oben beschriebenen Arbeitsverfahren aufraten, und die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse überprüfen wir experimentell mit Standardlösungen (Tabelle 2). Die bei der Analyse von Pflanzenmaterial gewonnenen Ergebnisse sind in Tabelle 3 zusammengefaßt.

TABELLE 2. VERLUSTE BEI DER AUFARBEITUNG VON NUCLEOTIDEN AUF IONENAUSTAUSCHERN UND MIT AKTIVKOHLE "KARBORAFIN"

	Dowex 50×4 n=6			Dowex 1×4 n=6		
	Einwaage in µg	$\bar{X} \pm S_x^*$ in µg	Verluste in %	Einwaage in µg	$\bar{X} \pm S_x$ in µg	Verluste in %
ATP	100	78,4 ± 3,3	22	109	84 ± 3,4	23
	12	9,2 ± 0,38	24	10,2	7,65 ± 0,35	25
ADP	82	75,5 ± 2,9	8	95	85,5 ± 3,2	10
	9	7,9 ± 0,25	12	8	6,8 ± 0,19	15
AMP	93	83,8 ± 2,9	10	90,7	80,5 ± 2,2	11
	7,3	6,35 ± 0,2	13	9,0	7,75 ± 0,21	14

$$* \bar{X} = \text{Wertiner messung.} \\ \bar{X} = \sum x/n. \\ S_x = \sqrt{\left[\frac{(X - \bar{X})^2}{n-1} \right]}.$$

TABELLE 3. BESTIMMUNG VON ATP, ADP UND AMP IN PFLANZENMATERIAL

	Gerstenblätter		Erbsenblätter	
	Dowex 50×4 n=6	Dowex 1×4 n=6	Dowex 50×4	Dowex 1×4 n=6
	$\bar{X} \pm S_x$ in µg/g	$\bar{X} \pm S_x$ in µg	$\bar{X} \pm S_x$ in µg	$\bar{X} \pm S_x$ in µg
ATP	12,1 ± 0,52	12,5 ± 0,45	—	16,5 ± 0,40
ADP	11,9 ± 0,31	12,1 ± 0,29	—	17,8 ± 0,26
AMP	6,3 ± 0,3	6,4 ± 0,24	—	5,25 ± 0,21

⁸ H. V. BERGMAYER, *Methods of Enzymatic Analysis*. Academic Press, New York (1963).

Zur Entfernung interferierender Stoffe aus dem Pflanzenmaterial erwies sich ein stark basischer Anionenaustauscher (Dowex 1 × 4) als besonders geeignet. Stark saure Kationenaustauscher (Dowex 50 W × 4) können nur in vereinzelten Fällen besonders bei der Analyse junger oder weniger pigmentierter Pflanzenorgane oder Gewebe verwendet werden. Der Vorteil des stark sauren Kationenaustauschers besteht aber in der Möglichkeit, die Nukleotide mit einer geringeren Menge von 0,8 M HCOONH₄ zu eluieren, wodurch eine Vakuumsublimation des angeführten flüchtigen Puffers möglich ist. Dadurch entfällt die Weiterverarbeitung der Probe mit Aktivkohle, wodurch die Verluste bei der Bestimmung von ATP, ADP und AMP geringer werden. Bei der Verwendung eines stark basischen Anionenaustauschers verhindert die große Menge des verwendeten HCOONH₄ im Eluat diese einfache Aufarbeitung.

Über die Verluste von Nukleotiden, besonders von ATP, bei der Aufarbeitung mit Aktivkohle bestehen recht entgegengesetzte Ansichten.^{2,9–12} Viele Verfasser wenden sich sogar gegen die Anwendung von Aktivkohle bei der quantitativen Bestimmung von Nukleotiden.⁹ Über die Genauigkeit der Bestimmung entscheidet aber die Qualität der Aktivkohle und die richtige Wahl des Elutionsmittels. Für Aktivkohlen des Typs Norit A sind pyridinhaltige Lösungen zur Elution der adsorbierten Nukleotide weniger geeignet, als ammoniakalisch alkoholische Lösungen, wie dies schon Bergkvist⁹ festgestellt hat (Tabelle 1). Bei unseren Aktivkohletypen ist es jedoch umgekehrt. Wie aus unseren Ergebnissen hervorgeht (Tabelle 2), bedingt Aktivkohle bedeutendere Verluste, besonders an ATP, die Ergebnisse sind aber sehr gut reproduzierbar, was schließlich die quantitative Auswertung ermöglicht.

Wenn wir unsere Versuchsergebnisse mit den Ergebnissen von Šebesta und Šorm¹³ vergleichen wollten, die die Verluste an ATP auf Norit A und Karborafin, freilich unter ganz anderen Versuchsbedingungen, verfolgten, können wir eine gewisse Übereinstimmung der Ergebnisse konstatieren.

Bei der Elution von ATP aus Norit A mit einer 5% wässrigen Lösung von Pyridin stellten diese Verfasser 36,5% Verluste fest, während diese Verluste bei einer Eluierung mit 25% Äthanol, das 0,5% Ammoniak enthielt, nur 30% betrugen. Dies bestätigt die Ergebnisse von Bergkvist⁹ und ist auch mit unseren Feststellungen im Einklang, laut denen pyridinhaltige Elutionslösungen, für die Desorption von Nukleotiden aus Aktivkohle des Typus Norit A nicht geeignet sind. Dieselben Verfasser geben die Verluste von ATP auf Karborafin unter ähnlichen Versuchsbedingungen mit 11,5% (Elutionslösung Pyridin) bzw. mit 7% (Elutionslösung Äthanol mit Ammoniak) an. Brown¹⁴ führt bei der Anwendung von Norit OL 20% Verluste für ATP und AMP an, sowie 1% Verluste für ADP.

Es muß noch betont werden, daß die enzymatische Bestimmung von ATP mit Hilfe von Phosphoglyzeratkinaise und von ADP mittels Pyruvatkinase nicht ganz spezifisch ist.

Bei der Bestimmung von ATP kann eine größere Menge anderer Nukleotidphosphate und zwar von ITP, GTP und UTP störend wirken, weil auch sie eine gewisse, wenn auch geringe Affinität zur Phosphoglyzeratkinaise besitzen. Aus ähnlichen Gründen können bei der Bestimmung von ADP größere Mengen von IDP, GDP und CDP stören. Andere, in biologischem Material enthaltene Stoffe stören die Bestimmung jedoch nicht.¹⁵

⁹ R. BERGKVIST, *Acta Chem. Scand.* **10**, 1303 (1956).

¹⁰ M. F. CHANINA, T. V. VENKSTER und A. A. BAEV, *Biokhimiya* **29**, 142 (1956).

¹¹ N. A. BIRO und B. NAGY, *Acta Physiol. Acad. Sci. Hung.* **1**, 127 (1956).

¹² K. K. TSUBOI und T. D. PRICE, *Archs. Biochem. Biophys.* **81**, 223 (1959).

¹³ K. ŠEBESTA und F. ŠORM, *Collection Czech. Chem. Commun.* **24**, 2781 (1959).

¹⁴ E. G. BROWN, *Biochem. J.* **85**, 633 (1962).

¹⁵ Arbeitsvorschriften zu den Testkombinationen TC-J und TC-K der Fa. Boehringer und Söhne, Mannheim.