

Unterschiedliche Desoxyribonuclease-Aktivitäten im Seminalplasma von Bullen

Different Deoxyribonuclease-Activities in Bull Seminal Plasma

G. H. Georgiew

Institute of Biology and Pathology of Animal Reproduction and Non-Infectious Diseases, Sofia

E. J. Zöllner und R. K. Zahn

Physiologisch-Chemisches Institut der Johannes-Gutenberg-Universität, Mainz

(Z. Naturforsch. 31 c, 626–627 [1976]; eingegangen am 10. Mai/28. Juni 1976)

Deoxyribonuclease, Seminal Plasma, Bull

By means of the *in situ* assay of deoxyribonucleases in DNA-containing polyacrylamide gels after separation by micro-disc-electrophoresis different deoxyribonucleases are detectable in bull seminal plasma. There are two groups of acid deoxyribonuclease-activities with a pH optimum at pH 5.0, one with a pH optimum at pH 7.4 and an additional one with a pH optimum at pH 8.5.

Desoxyribonucleasen des männlichen Geschlechtsapparates, im Sekret der akzessorischen Geschlechtsdrüsen und im Sperma der Säuger sind Gegenstand einer Reihe von Untersuchungen^{1–5}), worin der Versuch zur Klärung ihrer Teilnahme an den verschiedenen Prozessen der reproduktiven Biologie und Pathologie unternommen wird. Pinero und Roussel³ verbinden die Desoxyribonuclease-Aktivität im Nebenhoden mit seiner phagozytären Funktion, während Hitier und Honot⁶ den Einfluß des Vitamin-C-Mangels auf die Desoxyribonuclease-Aktivität in den Hoden untersuchen. Die Artbesonderheiten der Aktivität der Desoxyribonucleasen im Spermaplasma der verschiedenen Spezies waren Gegenstand der Untersuchungen von Quinn⁷. Die Angaben über den Polymorphismus der Desoxyribonuclease im Sperma und im reproduktiven Apparat der Säugetiere sind bedeutend spärlicher.

Mit der vorliegenden Arbeit stellten wir uns zur Aufgabe, elektrophoretische Untersuchungen über Desoxyribonucleasen im Bullenspermaplasma durchzuführen.

Material und Methoden

Zur Untersuchung benutzten wir 5 verschiedene Spermaproben gesunder, zur Zucht eingesetzter Bullen. Die Abtrennung der Spermien vom Spermaplasma erfolgte durch Zentrifugation, 15 min bei 4000 rpm, 4 °C (Sorvall SM 34 Rotor).

Sonderdruckanforderungen an Prof. Dr. E. J. Zöllner, Physiologisch-Chemisches Institut der Johannes-Gutenberg-Universität Mainz, Postfach 3980, D-6500 Mainz.

Die Trennung der Desoxyribonucleasen nahmen wir mit Hilfe einer micro-dis-elektrophoretischen Methode, detailliert beschrieben von Zöllner, Lachner und Zahn⁸, Zöllner, Heicke und Zahn⁹, sowie Lachner, Zöllner und Zahn¹⁰ vor. Zur optimalen Trennung der Desoxyribonucleasen verwendeten wir unterschiedliche Konzentrationen des Trenngels: 13,4% und 6,7% in 0,177 M Tris-H₂SO₄ pH 8,8, bei 5% Zwischen-Gel 0,176 M Tris-H₃PO₄ pH 6,7. Die Trennung erfolgte bei 700 µA/Gel in 90 min bei 4 °C mit anodischer Laufrichtung. Nach der Trennung inkubierten wir die Gele in standardisierten Inkubationslösungen: 0,1 M Na-Acetat-Puffer pH 5,0 + 5 × 10⁻³ M EDTA; 0,1 M Tris-HCl-Puffer pH 7,4 + 10⁻² M MgCl₂ + 10⁻³ M CaCl₂; 0,025 M Tris-HCl-Puffer pH 8,5 + 10⁻² M MgCl₂.

Die Inkubation erfolgte im Wasserbad bei 37 °C. Wir erprobten ebenfalls unterschiedliche Inkubationszeiten insbesondere zur Erreichung einer ablesbaren Differenzierung der molekularen Heterogenität der sauren Desoxyribonuclease-Aktivitäten. Als Substrat verwendeten wir native und denaturierte Herings-Sperma DNA. Die Denaturierung der DNA erfolgte durch Erhitzen im Wasserbad bei 100 °C für 10 min. Sofort nach dem Erhitzen erfolgte die Abkühlung der DNA im Eisbad. Zur Gelfärbung benutzten wir Galloxyanin-Chromalaun. Das mit Wasser gewaschene Gel wurde mit dem Densitometer (Kipp und Zonen) densitometrisch vermessen.

Zur Beurteilung der DNase-Aktivitäten der einzelnen Banden wurden die Densitometerkurven bekannter Konzentrationen von DNase I (spez. Akt. 2000 Einheiten/mg) herangezogen. Als Bezugseinheit diente ein Äquivalent von 1 ng DNase I/ml. Die planimetrierten Ausschläge der Densitometerkurven der Seminalplasmatrennungen wurden auf diese Eichlösungen bezogen⁸.

Ergebnisse und Diskussion

Unter Einsatz eines unterschiedlichen Inkubationsmilieus fanden sich im Spermaplasma von Bullen saure, neutrale und alkalische Desoxyribonuclease-Aktivitäten. Wir beobachteten zwei Gruppen von sauren Desoxyribonuclease-Aktivitäten, deren Auftrennung wir bei einer Gelkonzentration von 6,7%, einer Trennungszeit von 90 min, einer Inkubationszeit von 120 min und einer Verdünnung des Spermaplasmas von 1:20 erreichten (Abb. 1 a). Die sauren Desoxyribonucleasen im Spermaplasma der untersuchten Bullen weisen 2 Hauptbanden von 128 und 34 ng/ml DNase I Äquivalenten auf. Über das Vorliegen von zwei sauren Desoxyribonucleasen im Spermaplasma von Bullen berichten auch C. Cordonnier und G. Bernardi¹¹, die zu deren Auftrennung DEAE-Zellulose verwendeten.



Dieses Werk wurde im Jahr 2013 vom Verlag Zeitschrift für Naturforschung in Zusammenarbeit mit der Max-Planck-Gesellschaft zur Förderung der Wissenschaften e.V. digitalisiert und unter folgender Lizenz veröffentlicht: Creative Commons Namensnennung-Keine Bearbeitung 3.0 Deutschland Lizenz.

Zum 01.01.2015 ist eine Anpassung der Lizenzbedingungen (Entfall der Creative Commons Lizenzbedingung „Keine Bearbeitung“) beabsichtigt, um eine Nachnutzung auch im Rahmen zukünftiger wissenschaftlicher Nutzungsformen zu ermöglichen.

This work has been digitalized and published in 2013 by Verlag Zeitschrift für Naturforschung in cooperation with the Max Planck Society for the Advancement of Science under a Creative Commons Attribution-NoDerivs 3.0 Germany License.

On 01.01.2015 it is planned to change the License Conditions (the removal of the Creative Commons License condition "no derivative works"). This is to allow reuse in the area of future scientific usage.

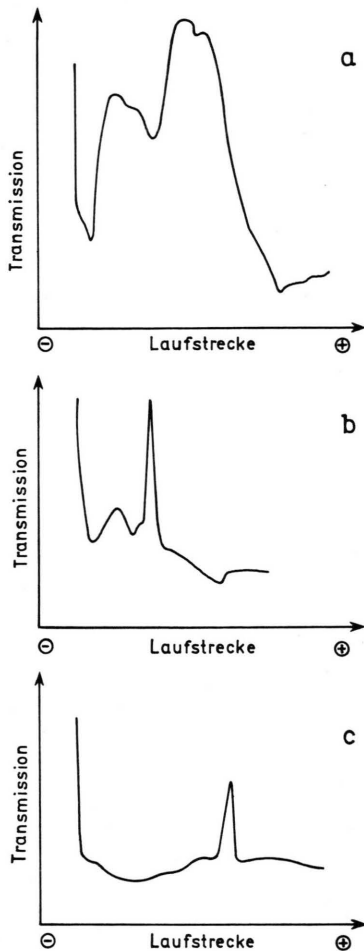


Abb. 1. Densitometerkurven von Micro-Disc-Elektrophoresegelelen zum DNase-Nachweis aus Bullenspermaplasma. Laufzeit 90 min bei $700 \mu\text{A}/\text{Gel}$. Probe: charakteristisches Bullenspermaplasma, a 1:20 verdünnt, b+c 1:2 verdünnt. a. 6,7% Trenngel, Inkubation 120 min in 0,1 M Na-Acetat pH 5,0, 5×10^{-3} M EDTA. b. 13,4% Trenngel, Inkubation 120 min in 0,1 M Tri-HCl, pH 7,4, 10^{-2} M MgCl_2 , 10^{-3} M CaCl_2 . c. 13,4% Trenngel, Inkubation 120 min in 0,025 M Tris-HCl, pH 8,5, 10^{-2} M MgCl_2 .

Die Aktivität der neutralen und sauren DNase-Aktivitäten im Spermaplasma der Bullen ist bedeutend geringer. So zeigte sich bei neutralen Inkubationsbedingungen eine etwas stärkere Aktivität, die 1,2 ng/ml DNase-I-Äquivalenten entspricht, und eine langsamer werdende kleinere zusätzliche Aktivität von 0,5 ng/ml DNase-I-Äquivalenten (Abb. 1 b). Aufgrund der elektrophoretischen Wanderungsgeschwindigkeit und der Inkubationsbedingungen läßt sich davon noch eine alkalische DNase-Aktivität abgrenzen, deren Aktivität bei 0,4 ng/ml DNase-I-Äquivalenten liegt (Abb. 1 c). Die geringe Aktivität der neutralen und alkalischen DNase-Aktivitäten erklärt Befunde, bei denen unter diesen Bedingungen keine DNasen nachgewiesen werden konnten⁴. Das Vorliegen dieser Aktivitäten sollte aber, wie auch die Heterogenität der sauren DNase-Aktivitäten, bei Untersuchungen zur biologischen Bedeutung der DNase im Seminalplasma berücksichtigt werden.

Bei der Zentralen Bullenhaltung und Besamungsgenossenschaft, Neumühle/Pfalz, bedanken wir uns für die Lieferung der Seminalplasmaproben.

- ¹ G. S. Gupta u. S. R. Bawa, J. Reprod. Fert. **44**, 2, 223–233 [1975].
- ² H. Karg, M. Waldschmidt u. B. Hoffmann, Proc. V Int. Congr. Amin. Reprod., Trento, **III**, 383–385 [1964].
- ³ G. J. Pinero u. J. D. Roussel, Fertility and Sterility **24**, 145–149 [1973].
- ⁴ M. Waldschmidt, H. Karg u. M. Linzler, Naturwissenschaften **51**, 364 [1964].
- ⁵ S. Zamenhof, L. B. Shettles u. E. Chargaff, Nature **165**, 765 [1950].
- ⁶ Y. Hitier u. A. M. Honot, Arch. Sci. Physiol. **24**, 3, 323–330 [1970].
- ⁷ P. J. Quinn, J. Reprod. Fert. **17**, 35–39 [1968].
- ⁸ E. J. Zöllner, H. Lachner u. R. K. Zahn, Z. Naturforsch. **28**, 742–746 [1973].
- ⁹ E. J. Zöllner, B. Heicke u. R. K. Zahn, Anal. Biochem. **58**, 74–76 [1974].
- ¹⁰ H. Lachner, E. J. Zöllner u. R. K. Zahn, Andrologia **6**, 255–262 [1974].
- ¹¹ C. Cordonnier u. G. Bernardi, Canad. J. Biochem. **46**, 989–995 [1968].