

ziehung zwischen Urinmenge im Ansatz (also Enzym-Konzentration) und Spaltungsrate.

5. Die pH-Aktivitätskurve ergibt ein Maximum bei pH 2,0 mit Hämoglobin als Substrat (Abb. 4a), bei pH 2,5 mit Nitro-Casein (Abb. 4b). In beiden Fällen findet sich im Gegensatz zu reinem Pepsin auch bei pH 3 noch beträchtliche proteolytische Aktivität, wie es auch von MIRSKY und Mitarbeitern (25) und FREIS und LEPLA (27) beobachtet wurde. MIRSKY und Mitarbeiter sind der Ansicht, daß auch die proteolytische Aktivität im pH-Bereich um 3,0 eine Magenprotease darstellt, weil sie bei Gastrektomierten nicht nachweisbar ist. Das pH-Optimum entspricht dem des Gastricins im Magensaft (28).

Arbeitsvorschrift

Aus den Vorversuchen ergab sich folgendes Standardverfahren:

2-stündige Dialyse von 20 ml/ eines während 24 Stdn. gesammelten Urins gegen fließendes Wasser; auf 25 ml/ mit dest. Wasser auffüllen. 1 ml/ dieses dialysierten Urins mit 5 ml/ 2-proz. Hämoglobin-Lösung in 0,5N HCl 60 Min. bei 37° inkubieren; pH der Reaktionsmischung $2,0 \pm 0,5$. Weiterverfahren wie mit den Serum-Bestimmungsansätzen; Doppelbestimmungen. Leerwert mit 1 ml/ dialysiertem Urin, der 10 Min. auf 65° erhitzt wurde. Die Pepsinogenkonzentration kann anhand einer Tyrosin-Eichkurve entsprechend MIRSKY (25) in mg Tyrosin-Äquivalent/ml/ angegeben und auf die Gesamt-Urinmenge umgerechnet werden. Sinnvoller ist es auch hier, anhand einer Eichkurve mit reinem Pepsin den Pepsinogengehalt des 24-Stdn.-Urins in mg Pepsin-Äquivalent anzugeben (Eichkurve Abb. 3b).

Literatur

1. BOCK, O. A. A., G. ARAPAGIS, L. J. WITTS und W. C. R. RICHARDS, *Gut*, 4, 106 (1963). — 2. GIBITZ, H. J. und F. KAINBERGER, *Wien. klin. Wschr.* 77, 217 (1965). — 3. GRAY, S. J., C. G. RAMSEY und R. W. REIFENSTEIN, *N. England J. Med.* 251, 835 (1954). — 4. MIRSKY, I. A., P. FUTTERMAN und S. KAPLAN, *J. Laborat. Clin. Med.*, S. Louis 40, 188 (1952). — 5. SLEISENGER, M. H., CH. M. LEWIS, M. LIPKIN und C. WIERUM, *Amer. J. Med.* 25, 395 (1958). — 6. SPIRO, M. U., A. E. RYAN und C. M. JONES, *Gastroenterol. Baltimore* 30, 563 (1956). — 7. CAMERON, I. M., *Brit. Med. J.* 1, 1182 (1960). — 8. EDWARDS, K., R. P. JEPSON und K. F. WOOD, *Brit. Med. J.* 1, 30 (1960). — 9. LICK, R. F., W. BRÜCKNER und W. HART, *Münch. med. Wschr.* 106, 581 (1964). — 10. SPIRO, R. M., A. E. RYAN und C. M. JONES, *N. England J. Med.* 253, 261 (1955). — 11. ADER, R., C. C. BEELS und R. TATUM, *Psychosom. Med.* 22, 1 (1960). — 12. ADER, R., *Psychosom. Med.* 25, 221 (1963). — 13. GESSLER, P. G., U. F. REISER und D. M. RIOCH, *J. Amer. Med. Ass.* 169, 1 (1959). — 14. MIRSKY, I. A., S. KAPLAN und R. H. BROH-KAHN, in: *Life, Stress and bodily disease*, S. 628, Williams and Wilkins Co. Baltimore, 1950. — 15. MIRSKY, I. A., *Amer. J. Digest. Dis.* 3, 285 (1958). — 16. ANSON, M. L., *J. Gen. Physiol.* 22, 79 (1938). — 17. MIRSKY, I. A., P. FUTTERMAN, S. KAPLAN und R. H. BROH-KAHN, *J. Laborat. Clin. Med.*, S. Louis 40, 17 (1952). — 18. SEIFFERS, M. J., L. L. MILLER und H. L. SEGAL, *Proc. Soc. exp. Biol. Med.* 118, 405 (1965). — 19. KUSHNER, J., W. RAPP und P. BURTON, *J. Clin. Invest.* 43, 1983 (1964). — 20. SEIFFERS, M. J., H. L. SEGAL und L. L. MILLER, *Amer. J. Physiol.* 205, 1099 (1963). — 21. SEIFFERS, M. J., H. L. SEGAL und L. L. MILLER, *J. Amer. Physiol.* 205, 1106 (1963). — 22. BUCHER, G. R. und A. C. IVY, *Amer. J. Physiol.* 150, 415 (1947). — 23. CHRISTENSEN, L. K., *Scand. J. Clin. Laborat. Invest.* 9, 377 (1957). — 24. GOODMAN, R. R., E. SANDOVAL und J. A. HALSTED, *J. Laborat. Clin. Med.*, S. Louis 40, 872 (1952). — 25. MIRSKY, I. A., S. BLOCK, S. OSHER und R. H. BROH-KAHN, *J. Clin. Invest.* 27, 818 (1948). — 26. WEST, P. M., ELLIS, F. W. und B. L. SCOTT, *J. Laborat. Clin. Med.*, S. Louis 39, 159 (1952). — 27. FREIS, A. und W. LEPLA, *Klin. Wschr.* 41, 1161 (1963). — 28. RICHMOND, V., J. TANG, S. WOLF, R. E. TRÜCCO und R. CAPUTTO, *Biochem. biophysica Acta (Amsterdam)* 29, 453 (1958).

Dr. H. Schmidt

2 Hamburg 20, Martinistr. 20

Disk-Elektrophoretische Trennung von Isoenzymen der sauren Prostata-Phosphatase

Von R. KASCHNITZ

Aus dem Institut für allgemeine und experimentelle Pathologie der Universität Wien (Vorstand: Prof. Dr. A. Lindner)

(Eingegangen am 24. November 1966)

Durch Disk-Elektrophorese eines Extraktes aus Prostatagewebe ließ sich ein aus vier Zonen bestehendes Isoenzymmuster der sauren Phosphatase erhalten. Es wird eine Apparatur beschrieben, die eine intensive Kühlung des Trenngels ermöglicht und dadurch die thermische Inaktivierung des Enzyms während der Trennung verhindert.

The acid phosphatase from an extract of prostata gland tissue was separated into four isoenzymes by disk-elektrophoresis. An apparatus is described which makes possible the intensive cooling of the gel and thereby prevents thermal inactivation of the enzyme.

Die molekulare Heterogenität der sauren Phosphatase aus menschlicher Prostata konnte in den letzten Jahren mit verschiedenen Methoden nachgewiesen werden. So ließen sich durch Chromatographie an DEAE-Cellulose, Gelfiltration und Ultrazentrifugierung zwei enzymatisch aktive Proteine isolieren (1—4). Bei Stärkegelelektrophoresen wurden komplexe Aktivitätsmuster beob-

achtet (5, 6). Immunologische Untersuchungen zeigten die Anwesenheit von vier verschiedenen Formen der sauren Phosphatase im Sekret und im Gewebe der Prostata (7).

In der vorliegenden Arbeit soll die analytische Auftrennung von Isoenzymen der sauren Prostata-Phosphatase durch Disk-Elektrophorese beschrieben werden.

Da dieses Enzym sehr temperaturempfindlich ist (1, 2, 8, 9), war es notwendig, eine Apparatur zu konstruieren, die eine intensive Kühlung des Trennmediums ermöglicht. Der Aufbau einer solchen Apparatur ist in den folgenden Abschnitten skizziert.

Methodik

Extraktion des Prostatagewebes

Hyperplastische Drüsen wurden tiefgefroren, in dünne Scheiben geschnitten (10) und zur Extraktion mit 0,09M Citronensäure/NaOH-Puffer von pH 4,9 (11) (25 ml auf 10 g Gewebe) versetzt. Dieser und alle folgenden Schritte wurden bei 4° vorgenommen. Nach 24-stdg. Stehen und anschließender Filtration durch Glaswolle wurde das trübe Filtrat 1 Std. bei 25000 g zentrifugiert, der Niederschlag verworfen und im klaren Überstand der Proteingehalt spektrophotometrisch bestimmt.

Apparat zur Disk-Elektrophorese

Der bei der vorliegenden Untersuchung verwendete Apparat (Abb. 1) wurde aus Plexiglas angefertigt und besteht aus drei zylindrischen Kammern (A, B, C) und einem kreisrunden Deckel D, der die obere Elektrode E_2 trägt. Die obere Kammer A und die mittlere Kammer B sind fest miteinander verbunden. In der unteren Kammer C befindet sich die Elektrode E_1 , die durch einen Gummiring abgedichtet ist. Als Elektroden werden Kohlestifte aus einer Stabbatterie verwendet. Je sechs Bohrungen in der Grund- und Deckfläche der Mittelkammer B mit eingelegten Gummidichtungsringen (G) dienen zur Aufnahme der Trennröhrchen. Zur Verwendung gelangten silikonisierte Röhrchen aus Jenaer Glas (Länge 75 mm, innerer Durchmesser 5 mm), deren Enden zur leichteren Einführung in die Dichtungsringe G konisch zugschliffen wurden. Bei eingesetzten Trennröhrchen kann die Mittelkammer durch die Schlauchansatzstücke S mit Kühlflüssigkeit durchströmt werden, wodurch eine bessere Wärmeabfuhr als bei handelsüblichen bzw. in der Literatur beschriebenen Apparaturen (12, 13) erzielt wird. Zur Aufnahme der Entfärberröhrchen (innerer Durchmesser 7 mm) (12) dient ein zweiter Mittelteil (Kammern A und B), der mit größeren Bohrungen versehen ist. Auch in diesem Fall kann die mittlere Kammer gekühlt werden, um bei der elektrolitischen Entfärbung Blasenbildung im Trenngel (14) zu vermeiden.

Elektrophorese-Verfahren

Bei der Herstellung der Acrylamid- und der Pufferlösungen wurde nach den Vorschriften von DAVIS (12) bzw. WILLIAMS und REISFELD (15) vorgegangen. Die Acrylamid-Konzentrationen betragen im Trenngel 7,5% und im Obergel 2,9%. Die pH-Werte lagen bei 7,63 (Trenngel), 5,64 (Obergel) und 7,32 (Elektrodenpuffer, Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan-Diäthylbarbitursäure). Pro Röhrchen wurde eine Probenmenge von etwa 200 µg Protein, entsprechend 20–25 µl Drüsenextrakt, eingesetzt. Die Elektrophoresedauer betrug 3 Stdn. bei einer Klemmenspannung von 220 V und einer Stromstärke von 4–5 mA je Röhrchen. Die Mittelkammer B des Apparates wurde zur Kühlung mit 30-proz. wäbr. Alkohol (Temperatur 4°) an einen Kryostat (Modell „UK-30 D“, Fa. Meßgerätewerk Lauda) angeschlossen. Bei einer Elektrophorese ohne Kühlung (zur Überprüfung des Temperatureffektes) zeigte sich, daß die Klemmenspannung auf 110 V erniedrigt werden mußte, um die Bildung von Hitzeblasen im Gel zu verhindern. Die Elektrophoresedauer betrug bei diesem Versuch 4 Stdn.

Phosphatasenachweis im Gel

Nach Beendigung der Elektrophorese wurde das Trenngel 15 Min. in Citratpuffer (pH 4,9) eingelegt, um das pH-Optimum der sauren Phosphatase (2) zu erreichen. Die Lokalisierung des Enzyms erfolgte durch Inkubation mit einer Lösung von Natrium-1-naphtylphosphat und Variaminblausalz B (jeweils 0,5-proz. in Citratpuffer

(16)). Die Inkubationsdauer betrug bei Zimmertemperatur 5–10 Min., in einzelnen Fällen aber bis zu 90 Min., wobei wegen der Lichtempfindlichkeit des Farbstoffes im Dunkeln gearbeitet werden mußte. Die Reaktion wurde durch Austausch der Substrat/Farbstoff-Lösung gegen 7,5-proz. Essigsäure zum Stillstand gebracht. Der überschüssige Diazofarbstoff ließ sich aus dem Gel mit 7,5-proz. Essigsäure auswaschen, um die braun gefärbten Zonen der Enzymaktivität zur Darstellung zu bringen. Bei Versuchen zur Hemmung des Enzyms wurden der Reaktionslösung 2% Tartrat zugesetzt (17). Zur Darstellung des Proteinmusters wurde wie üblich mit Amidoschwarz 10 B angefärbt.

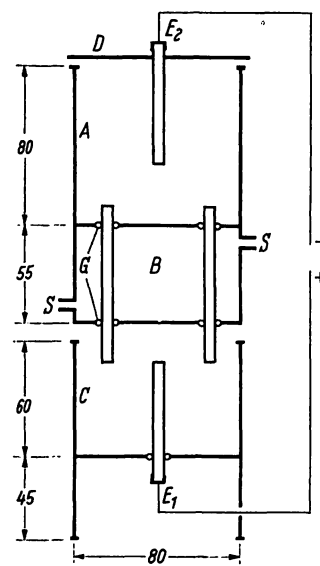


Abb. 1
(Abmessungen in mm)

Ergebnisse

Das in den vorhergehenden Abschnitten beschriebene Verfahren erbrachte einerseits eine Auftrennung der löslichen Proteine aus Prostatagewebe in zehn, mit Amidoschwarz lokalisierbare Banden (Abb. 2a) und andererseits ein aus vier Zonen bestehendes Isoenzymmuster der sauren Phosphatase (Abb. 2b).

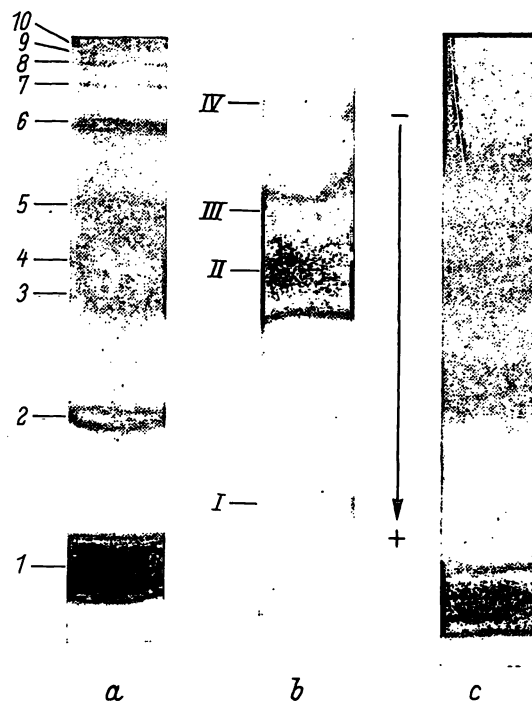


Abb. 2

Im Muster der enzymatischen Aktivität tritt Zone II am stärksten hervor, sie liegt etwa auf der Höhe der Proteinbanden Nr. 3 und 4. Dagegen entspricht der intensivsten Proteinbande (Nr. 1) die schwächste enzymaktive Zone (I). Die beiden restlichen Phosphatasezonen III und IV könnten den Proteinbanden Nr. 5 und 6 zugeordnet werden. In Gegenwart von Tartrat wird die Anfärbung aller vier Zonen gehemmt, eine für die saure

Prostata-Phosphatase charakteristische Erscheinung (7, 17). Das Auftreten von vier Aktivitätszonen steht in Übereinstimmung mit den Ergebnissen der immunologischen Untersuchung von SHULMAN und FERBER (7), die durch Doppeldiffusion vier phosphatasespezifische Präzipitationslinien erhielten. Allerdings bringt die Anwendung der Disk-Elektrophorese für den qualitativen Nachweis der Phosphatase-Isoenzyme den Vorteil eines wesentlich geringeren zeitlichen und experimentellen Aufwandes mit sich, da z. B. langwierige Immunisierungen von Versuchstieren überflüssig sind.

Bei einer Elektrophorese wurde zur Prüfung des Temperatureinflusses die Kühlung abgeschaltet und die Trennung bei Zimmertemperatur vorgenommen. Unter diesen Bedingungen erreicht die Temperatur im Trenngel etwa 40° (12). Dabei ist bereits eine beträchtliche Inaktivierung des Enzyms zu erwarten (1, 2, 8, 9). Das Ergebnis dieses Versuches erwies auch, daß die Aktivität der sauren Phosphatase fast völlig verschwunden war. Nach einer Inkubationszeit von 90 Min. war nur eine schwache Zone zu erkennen, diesmal auf der Höhe der Protein-

bande Nr. 1. Auch das Proteinmuster (Abb. 2c) erschien gegenüber der Auftrennung bei 4° wesentlich diffuser, wie der Vergleich der Abb. 2a mit 2c zeigt. Dies unterstreicht die Notwendigkeit einer wirksamen Kühlung. Das einfache Einbringen der gesamten Apparatur in einen Kühlraum und Absenken der Stromstärke (12) erscheint wenig befriedigend, da hierbei einerseits eine lokale Überhitzung im Trenngel nicht ausgeschlossen werden kann und andererseits die Laufzeit verlängert wird. Auch beim vollständigen Eintauchen der Trennröhrchen in den unteren Elektrolyten (18) wird die Kühlung der Trennröhrchen nur durch Konvektion bewirkt und erfordert weiterhin die Außenkühlung des gesamten Apparates. Demgegenüber ist bei der beschriebenen Apparatur durch den direkten Kontakt des strömenden Kühlmediums mit den Trennröhrchen eine rasche und vollständige Abführung der Stromwärme gewährleistet, ohne daß im Kühlraum gearbeitet oder die Stromstärke erniedrigt werden muß.

Herrn H. KINK danke ich für die Anfertigung der Elektrophorese-Apparatur.

Literatur

1. VERNON, C. A., J. GAULDIE, J. M. HANSON, J. M. HUMPHREYS, P. E. SMITH, A. J. LAWRENCE und B. E. C. BANKS, *Nature London* 208, 382 (1965). — 2. OSTROWSKY, W. und A. TSUGITA, *Arch. Biochem. Biophysics* 94, 68 (1961). — 3. OSTROWSKY, W. und J. RYBARKA, *Biochim. biophysica Acta (Amsterdam)* 105, 196 (1965). — 4. ANGELETTI, P., B. MOORE, V. SUNTZEFF und R. GAYLE, *Proc. Soc. exp. Biol. Med.* 108, 53 (1961). — 5. SUR, B. K., D. W. MOSS und E. J. KING, *Biochem. J.* 84, 55 P (1962). — 6. BECKMAN, L., *Isoenzyme Variations in Man—Monographs in Human Genetics*, Bd. 1 S. 36f. S. Karger AG. Basel-New York (1966). — 7. SHULMAN, S. und J. M. FERBER, *J. Reprod. Fert.* 11, 295 (1966). — 8. JACOBSON, K., *Scand. J. Clin. Laborat. Invest.* 12, 367 (1960). —
9. WOODARD, H. G., *Amer. J. Med.* 27, 902 (1959). — 10. LONDON, M. und P. B. HUDSON, *Arch. Biochem. Biophysics* 46, 141 (1953). — 11. RICHTERICH, R., *Klinische Chemie*, S. 360. Akad. Verlagsges. Frankfurt/M. (1965). — 12. DAVIS, B. J., *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 121, 404 (1964). — 13. ROGERS, L. J., *Biochim. biophysica Acta (Amsterdam)* 94, 324 (1965). — 14. MAURER, H. R., *diese Z.* 4, 85 (1966). — 15. WILLIAMS, D. E. und R. A. REISFELD, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 121, 373 (1964). — 16. ALLEN, J. M. und J. GOCKERMAN, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 121, 616 (1964). — 17. ABUL-FADL, M. A. M. und E. J. KING, *Biochem. J.* 42, XXVIII (1942). — 18. CLARK, J. T., *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 121, 428 (1964).

Dr. Robert Kaschnitz

A 1090 Wien, Währinger Straße 13

Kinetische Messung der α -Amylase-Aktivität durch amyloklastische Endpunktbestimmung auf Papier

Von G. HILLMANN, G. BEYER und R. STEGER

Aus dem Chemischen Institut der Städtischen Krankenanstalten Nürnberg (Vorstand: Prof. Dr. G. Hillmann)

(Eingegangen am 22. Dezember 1966)

Die amyloklastische Endpunkt-Bestimmung der α -Amylase-Aktivität wird durch kontinuierliches Auftropfen von α -Amylose/Amylase-Mischungen, die Jodid- und Jodat-Ionen enthalten, auf angesäuertes Papier bei Raumtemperatur durchgeführt. Die Zeit vom Zusammengabe der Enzym-Substrat-Mischung bis zum auf dem Papier leicht sichtbaren Farbwechsel von Blau (Jod/Stärke) nach Gelbbraun (Jod) wird registriert. α -Amylase-Einheiten werden aus SOMOGYI's Faktor/Zeit-Beziehung abgeleitet.

The amyloclastic endpoint-determination of α -amylase-activity is performed by the continuous dropping of buffered α -amylase-amylose-mixtures, containing J^- and JO_3^- -anions, on to acidified paper at room-temperature. Time is registered from the initiation of the enzyme-substrate-mixture to an easily visible colour-change (jodine-starch-blue to jodine-brown-yellow), produced sharply on the paper. α -amylase units are derived from SOMOGYI's factor-time-relation.

Die meisten modernen Routineverfahren zur Bestimmung der α -Amylaseaktivität in Körperflüssigkeiten beruhen auf der diskontinuierlichen photometrischen Messung der Extinktionsabnahme des Jodstärkekompleses (1). Die Rationalisierungsmöglichkeiten für Serienmessungen sind durch den großen physiologischen Variationsbereich, der häufig mehrfache Probenver-

dünnungen erforderlich macht, sowie durch die verschiedenen Reagenzienpipettierungen begrenzt. Die Präzision der amyloklastischen Endpunktmethode (2) (Zeitmessung bis zum Eintritt des Farbumschlags von blau nach hellbraun) wird durch die Schwierigkeit in der Festlegung des Farbumschlags beeinträchtigt. Diese im Prinzip einfachste kinetische Messung ist wegen der