

Der Einfluß von verschiedenartigen Substraten auf die α -Amylase-Heterogenitätsbestimmung

Von J. KAMARÝT

Aus dem Forschungsinstitut für Pädiatrie (Direktor: Prof. MUDr. Z. Brunecký, C. Sc.) Brno (CSSR)

(Eingegangen am 9. Juni 1967)

Die Substrat-Qualität beeinflusst bei der Bestimmung von Isoamylasen die Anzahl der ermittelten Fraktionen nicht. Die Höhe der Aktivitäten wird nach der Entwicklung der enzymatischen Reaktion mit verschiedenen Substraten in übereinstimmenden Relationen erfaßt. Bei der Verwendung hydrolysiertes Stärke als Substrat ergeben sich die Isoenzymfraktionen als scharfe Banden, welche gut auswertbar und für die Photodokumentation geeignet sind. Es ist anzunehmen, daß der Nachweis mit nativer Stärke empfindlicher als mit hydrolysiertes ist. Die Banden liegen dicht beieinander. Die Photodokumentation kann am selben Tage durchgeführt werden. Der Nachweis mit nativer Stärke ermöglicht eine einfache visuelle Differenzierung der unechten amyolytischen Zonen. Leber-Glykogen als Substrat ist sehr kostspielig und die Ergebnisse stimmen mit denen überein, welche mit Stärke erhalten werden.

Die Versuche zeigen, daß die Amylase-Heterogenitäts-Bestimmung, deren Bedeutung für die Genetik und Diagnostik schon heute unbestreitbar ist, durch die Verwendung verschiedener Substrate mit geringeren Fehlern belastet ist als die Gesamt-Aktivitätsbestimmung dieses Enzyms. Die Verwendung verschiedener Substrate ermöglicht eine besonders sichere Auswertung der echten Isoamylasen.

In the determination of isoamylases, the substrate used does not influence the number of recorded isoenzymes. The relative intensities of activity of each isoenzyme fraction are also the same with different substrates. When hydrolysed starch is used as the substrate, the isoenzyme fractions appear as sharp bands, which are easily evaluated and suitable for photodocumentation. The detection is more sensitive with native than with hydrolysed starch. The bands are close together. The separation can be photographed on the same day. By using native starch, the spurious amyolytic zones can be detected visually. Liver glycogen is very expensive and the results agree with those obtained with starch.

By using different substrates, amylase heterogeneity, which is nowadays undoubtedly important for genetics and diagnosis, can be determined with less error than in the measurement of total activity of the enzyme. The use of different substrates is especially suitable for detecting and evaluating the true isoamylases.

Vor zwei Jahren haben wir eine Modifikation der elektrophoretischen Trennung der α -Amylase¹⁾ im menschlichen biologischen Material gleichzeitig mit unseren ersten Erfahrungen und Ergebnissen über die Heterogenität dieses Enzyms veröffentlicht (1).

Mit der Methode der Agar-Elektrophorese von Serum oder Urin bei pH 8,4 und nach der Inkubation mit Substrat (hydrolysiertes Stärke) ist es in der Regel möglich, mit der Lugol-Lösung zwei Amylase-Fraktionen zu identifizieren. Den Ursprung dieser beiden Aktivitäten in Serum und Harn haben wir mit Hilfe der elektrophoretischen Analyse des Speichels und Duodenalsaftes bestätigt. Beide Isoamylasen sind im Elektropherogramm der Serumproteine zwischen den β - und γ -Globulinen lokalisiert (Abb. 1). Die Amylase-Heterogenität, d. h. die Anzahl der Fraktionen, ist in Serum und Harn des jeweiligen Probanden identisch, nur die relativen Aktivitäten der Speichel-Amylase und Pankreas-Amylase sind in Serum und Harn unterschiedlich.

In einer Gruppe von uns untersuchter Familien sind sechs verschiedene Amylase-Heterogenitäts-Varianten beobachtet worden. Die Typen der Varianten sind in der schematischen Übersicht angegeben (Abb. 2). Alle diese Varianten sind autosomal kodominant hereditär, was in allen untersuchten Fällen nachgewiesen werden konnte. Die genetischen Aspekte wurden in einer separaten Arbeit ausführlich erläutert (2).

Das Problem der Amylase-Heterogenität im menschlichen biologischen Material wird heute in zahlreichen Arbeiten diskutiert. Alle Autoren sind sich aber sowohl über die Anzahl der Isoamylasen als auch deren elektrophoretische Beweglichkeit uneinig.

Wie allgemein bekannt ist, hängt die Bestimmung der Gesamt-Amylase-Aktivität von der Qualität des Substrates ab. Um den Einfluß verschiedener Substrate auf die Heterogenitäts-Bestimmung der Amylase und die Identität der einzelnen mit unserer modifizierten Me-

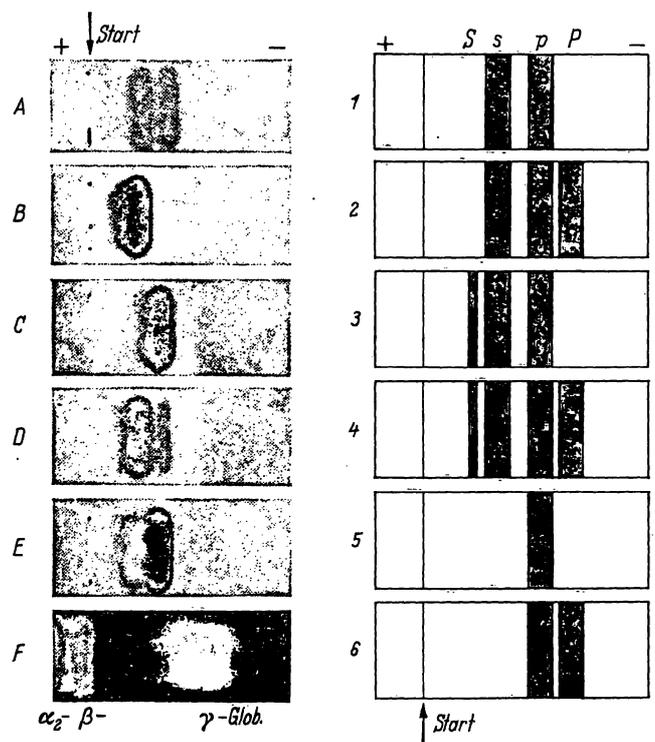


Abb. 1

Abb. 2

Abb. 1

Die Isoamylasen in verschiedenen Körperflüssigkeiten

A = Blutserum; B = Speichel; C = Duodenalsaft; D = Speichel und Duodenalsaft (gemischt); E = Harn; F = Elektropherogramm der Serumproteine

Abb. 2

Die Amylase-Heterogenitätsvarianten

s = die 1. Speichel-Fraktion; p = die 1. Pankreas-Fraktion; S = die 2. Speichel-Fraktion; P = die 2. Pankreas-Fraktion

¹⁾ Der Trivialname α -Amylase wird hier gebraucht für das Enzym α -1,4-glucan 4-glucanohydrolyse EC 3.2.1.1.

thode nachgewiesenen Isoamylasen festzustellen, haben wir neben der hydrolysierten Kartoffel-Stärke auch Leber-Glykogen und native Kartoffel-Stärke als Substrat benutzt.

Methodik

Die elektrophoretische Trennung der Amylasen in biologischem Material führen wir in 1proz. Agar (welcher mit Veronal-Pufferlösung auf pH 8,4 und Ionenstärke 0,05 eingestellt wird) auf Objektträgern (26 x 76 mm) durch. Das biologische Material wird (mit 2proz. Agar ana partes verdünnt) in eine kleine Rille 1 x 16 mm), welche sich 18 mm von der anodischen Agargel-Schicht befindet, gefüllt. Die Trennung (ohne Kühlung) dauert 2 Stdn. bei 5 V/cm und 5–6 mA pro Schicht. Nach der Elektrophorese wird die Träger-Schicht mit sogenannten Reagenz-Agargel-Schichten, welche jeweils verschiedene Substrate enthalten, bedeckt (Sandwich-Methode). Wir verwendeten

- 0,5proz. Lösung von hydrolysierte Kartoffel-Stärke,
- 0,5proz. Lösung von Leber-Glykogen,
- 0,5proz. Lösung von nativer Kartoffel-Stärke.

Jede Reagenz-Schicht enthält daneben auch 0,02% NaCl. Die Sandwiches werden in feuchtem Milieu im Brutschrank bei 37° eine Std. inkubiert. Nach der Inkubation werden die Reagenz-Schichten entfernt und die Elektrophorese-Schichten 80 Sek. in Lugol-Lösung getaucht. Nach Abspülen mit Wasser sind die Isoamylasen sichtbar.

Das Serum wird für die Bestimmung unverdünnt verwendet, der Harn wird mit dest. Wasser 1 : 3 verdünnt.

Ergebnisse

Beim Nachweis mit *hydrolysierte Stärke* ist der Hintergrund des Agargel-Plättchens braunviolett gefärbt und die Amylaseaktivitäts-Zonen erscheinen als helle Streifen. Diese braunviolette Färbung ändert sich im Verlauf von 24 Stdn. in dunkelblau und nach dieser Zeit kann man die Zymogramme durch Projizieren auf Photopapier dokumentieren. Auf diese Weise sind alle unsere Bilder hergestellt. Die Isoamylasen sind daher als dunkle Banden auf hellem Untergrund sichtbar (Abb. 3A).

Wurde *Leber-Glykogen* für die Isoamylaseaktivitäts-Entwicklung benutzt, sind die Fraktionen hell auf braunrotem Untergrund. Es ist hier notwendig, die photographische Dokumentation sofort durchzuführen, weil die Anfärbung sehr bald verschwindet (Abb. 3B).

Enthält die Reagenz-Schicht *native Stärke* als Substrat, ist der Hintergrund der Agargel-Schicht schwach blau gefärbt, während die Amylase-Fraktionen dunkelblaue Zonen bilden. Das Bild ist also umgekehrt dem, welches in Versuchen mit hydrolysierte Stärke oder Glykogen gefunden wurde (Abb. 3C). Dagegen sind die Amylase-Heterogenität und auch die Aktivität der einzelnen Fraktionen, welche im gleichen biologischen Material mit diesen drei erwähnten Substraten bestimmt wurden, identisch.

Die paradox starke blaue Farbe der Isoamylasen (Abb. 4, II A, B, C, D) nach der enzymatischen Reaktion mit nativer Stärke hängt wahrscheinlich von der Größe und Verzweigung der Stärkemoleküle ab. Dieses Molekül diffundiert während der Inkubation sehr langsam durch das Agargel. In Zonen, wo die Isoamylasen im Elektropherogramm lokalisiert werden, ist die Diffusion im Bestreben, den Enzym-Substrat-Komplex zu bilden, ge-

wissermaßen beschleunigt. Diese unsere Vermutung wird dadurch, daß die Mitte der Isoamylase-Fraktion mit der hohen Aktivität eine Aufhellung aufweist, während die Kontur dieser Fraktion dunkelblau bleibt, bestärkt (Abb. 4, II D). Auch wenn die gefärbten Zymogramme über Nacht in feuchtem Milieu belassen werden, werden

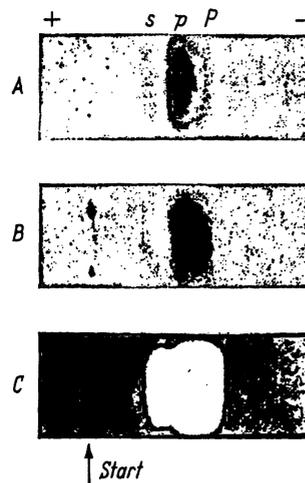


Abb. 3

Die Isoamylase-Entwicklung mit verschiedenen Substraten (Blutserum) Variante s p P.

A = Hydrolysierte Kartoffel-Stärke; B = Leber-Glykogen; C = Native Kartoffel-Stärke

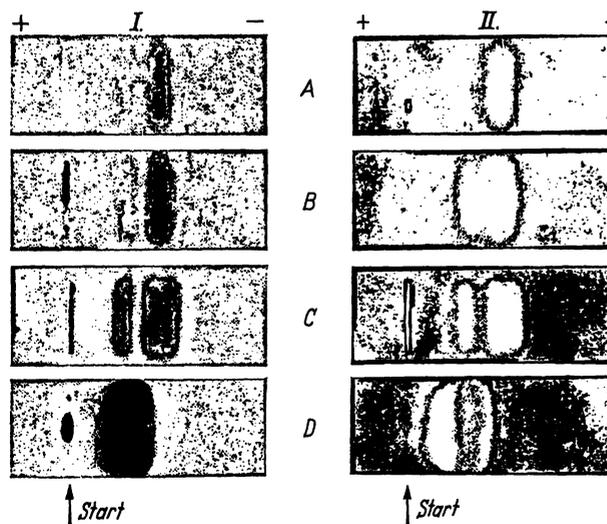


Abb. 4

Mit hydrolysierte (I) und nativer (II) Stärke entwickelte Amylase-Heterogenitätsvarianten in Serum (A), Harn (B, C) und Speichel (D)

infolge der langsamen Stärke-Diffusion und des gleichzeitigen langsamen Verlaufes der enzymatischen Reaktion die Fraktionen hell, bis sie endlich ungefärbte Zonen hinterlassen.

Bei Verwendung hydrolysierte Stärke (Dextrine), diffundiert das Substrat gleichmäßig und wesentlich schneller und die enzymatische Reaktion läuft schneller ab. Aus dieser beschleunigten Diffusion resultieren ein intensiv gefärbter Hintergrund und wenig gefärbte oder farblose Zonen der Isoamylasen.

Diskussion

Manche Autoren (3) haben festgestellt, daß der größte Teil der Serum-Amylaseaktivität nach der Elektrophorese in der Albumin-Fraktion konzentriert ist und daß diese Amylase ihren Ursprung in der Leber hat. FRANZINI und MODA (4) haben bei der Papierelektrophorese zwei amyolytische Fraktionen im Harn gefunden. Nach ihren Angaben ist im normalen menschlichen Harn die größte Aktivität in der γ -Globulinfraktion, die zweite, niedrigere Aktivität, welche in der β -Globulinfraktion sichtbar ist und hauptsächlich im Harn der Kranken mit Virus-Hepatitis ansteigt, stammt nach diesem Autor aus der Leber.

SEARCY und Mitarb. (5) haben darauf hingewiesen, daß für die Stärke-Entfärbung der Zonen im Elektropherogramm die Reaktion der Serumproteine mit Jod verantwortlich ist. Der Mechanismus dieser Reaktion wurde bisher noch nicht ausführlich erklärt. Die Befunde von SEARCY und Mitarb. (5) zeigen die Konkurrenz des menschlichen Albumins und auch des γ -Globulins mit der Stärke um das Jod. Die Steigerung der Albuminkonzentration in der Serumprobe von 2,75–5,75 g/100 ml/erhöht die unechte Amylase-Aktivität bis zu 30%. Für die Entwicklung der Jod-Stärke-Reaktion ist auch der pH-Wert sehr wichtig. Die Färbbarkeit steigt in sauren Lösungen und sinkt in alkalischen. Der achromatische Punkt des Jod-Stärke-Komplexes liegt bei pH 10,5.

Abbildung 5 stellt die Amylase-Heterogenität im Serum dar. Als Substrat wurde hydrolysierte Stärke (Abb. 5A) bzw. native Stärke verwendet (Abb. 5B). Der letzte Streifen entspricht dem Elektropherogramm der Serumproteine (Abb. 5C). Um alle vorhandenen Amylase-Fraktionen zu erfassen (3, 4), ist der Start der Elektrophorese in der Mitte der Agarose-Schicht angebracht. Die erste Probe zeigt zwei Aktivitäten zwischen den Banden der β - und γ -Globuline. In der Albumin- und α -Globulin-Fraktion sind zwei helle Zonen zu erkennen. Auf dem noch feuchten Zymogramm stellen alle erwähnten Zonen helle, aber verschieden gefärbte Streifen auf dunkelblauem Untergrund dar. In Zonen echter Amylaseaktivitäten, d. h. zwischen dem β - und γ -Globulin, sind mehr oder weniger hellblaue Fraktionen sichtbar. Die Banden, welche MCGEACHIN und LEWIS (3) in der Albumin-Fraktion und FRANZINI und MODA (4) in der β -Globulin-Fraktion als Leber-Amylase be-

urteilen, sind blaugrün und im Vergleich mit dem dunkelblauen Untergrund täuschen sie Amylase-Aktivitäten vor. Bei der Photodokumentation wirkt diese gelbgrüne Färbung als Filter und das Photopapier bleibt hier nach der Exposition hell.

Noch besser unterscheidbar sind die Farbstufen der echten Isoamylasen und der scheinbaren Aktivitäten bei Benutzung nativer Stärke. Die vermuteten Leber-Amylase-Fraktionen sind hier deutlich gelbgrün, wo-

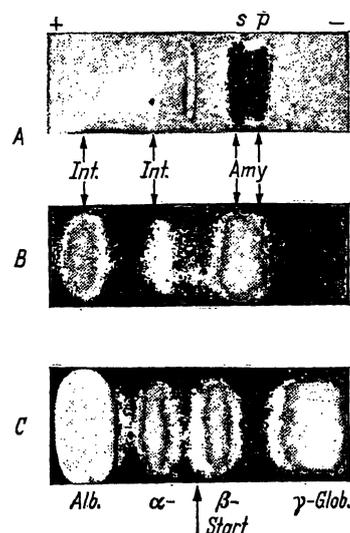


Abb. 5

Nachweis der echten Isoamylasen.

A = Nachweis mit hydrolysierte Stärke; B = Nachweis mit nativer Stärke; C = Elektropherogramm der Serumproteine; Int = Reaktion Jod-Albumin bzw. Jod-Bilirubin; Amy = die echten Isoamylasen; s = Speichelamylase, p = Pankreasamylase

gegen die Zonen mit amyolytischer Aktivität die aus der Speicheldrüse und dem Pankreas stammt, dunkelblau sind. Die Dokumentation auf Photopapier stellt alle diese Zonen als helle Banden auf dunklem Untergrund (Abb. 5B) dar. Nach unseren Erfahrungen entstehen die unechten amyolytischen Zonen als Folge einer Reaktion von Jod mit Bilirubin.

In der γ -Globulin-Fraktion haben wir entgegen den Angaben von SEARCY und Mitarb. (5) die Reaktion von γ -Globulin mit Jod und die dadurch bedingte Aufhellung nicht beobachtet. Auch die Leber-Amylase, über die MCGEACHIN und Mitarb. (3) sowie FRANZINI und Mitarb. (4) berichten, haben wir weder im Blutserum noch im Harn nachweisen können.

Literatur

1. KAMARÝT, J. und R. LAXOVÁ, Humangenetik, 1, 579 (1965). —
2. KAMARÝT, J. und R. LAXOVÁ, Humangenetik, 3, 41 (1966). —
3. MCGEACHIN, R. L. und LEWIS, zit. nach R. H. S. THOMPSON und E. J. KING, Biochemical disorders in human disease. Churchill Ltd., London (1964). —
4. FRANZINI, C. und S. MODA, J. Clin. Path., London, 18, 775 (1965). —
5. SEARCY, R. L., S. HAYASHI, F. M. HARDY und J. E. BERK, Clin. chim. Acta (Amsterdam) 12, 631 (1965).

RNDr. Jaromir Kamarýt, C.Sc.
Forschungsinstitut für Pädiatrie
Brno / CSSR
Cernopolni 9