

- HANSON, H. und R. J. HASCHEN, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 310, 213 (1958). — 20. NAGEL, W., F. WILLIG und F. H. SCHMIDT, Klin. Wschr. 42, 447 (1964). — 21. FLEISHER, G. A., M. PANKOW und C. WARMKA, Clin. chim. Acta (Amsterdam) 9, 254 (1964). — 22. KNÖPFER, M., Mh. Chem. 30, 31 (1909). — 23. PESEZ, M. und A. PETIT, Bull. soc. chim. France 1947, 122. — 24. WATT, G. W. und J. D. CHRISP, Analytic. Chem. 24, 2006 (1952). — 25. THIES, H. und G. KALLINICH, Biochem. Z. 324, 485 (1953). — 26. YALE, H. L., K. LOSEE, J. MARTIUS, H. HOLSING, F. M. PERRY und J. BERNSTEIN, J. Amer. chem. Soc. 75, 1933 (1953). — 27. LOSSE, G., H.-J. Hebel und CH. KÄSTNER, J. prakt. Chem. 8, 339 (1959). — 28. KÄSTNER, CH., Diplomarbeit, Mat.-Nat. Fak., Halle/Saale, 1959. — 29. CHAMBERS, R. A. und F. H. CARPENTER, J. Amer. chem. Soc. 77, 1522 (1955). — 30. WERGIN, A., Naturwissenschaften 52, 34 (1965). — 31. KALLOS, J., D. KAHN und D. RIZOK, Canad. J. Biochem. 42, 235 (1965). — 32. KALLOS, J., E. L. ARTHUR, D. RIZOK und D. KAHN, Canad. J. Biochem. 43, 135 (1965). — 33. Report of the Commission on Enzymes of the International Union of Biochemistry, Pergamon Press, Oxford 1961. — 34. AEBI, H., in: RAUEN, H. M. (Hrsg.): „Biochemisches Taschenbuch“, 2. Teil, S. 167, Springer-Verlag, Berlin-Göttingen-Heidelberg-New York 1964. — 35. BEESE, J., W. FARR, E. GRÜNER und R. J. HASCHEN, Klin. Wschr. 44, 1049 (1966). — 36. BAMANN, E., J. G. HAAS und H. TRAPPMANN, Naturwissenschaften 46, 73 (1959). — 37. LINEWEAVER, H. und D. BURK, J. Amer. chem. Soc. 56, 658 (1934). — 38. NETTER, H., Theoretische Biochemie, Springer-Verlag, Berlin-Göttingen-Heidelberg 1959. — 39. HUGHES, H. K., Analytic. Chem. 24, 1349 (1952). — 40. RICHTERICH, R., Klinische Chemie, S. 52, S. Karger, Basel-New York 1965.

Prof. Dr. med. habil. R. J. Haschen
X 402 Halle (Saale), Leninallee 2

Zur Immunochemischen Bestimmung von Enzymproteinen der Alkoholdehydrogenase mit Hilfe der Nephelometrie¹⁾

Von T. O. KLEINE

Aus dem Physiologisch-Chemischen Institut der Universität Hamburg (Direktor: Prof. Dr. J. Kühnau)

(Eingegangen am 4. März 1967)

Mit Hilfe von präzipitierenden, auf Alkoholdehydrogenase aus Hefe und Pferdeleber spezifischen Antikörpern wird ein Mikrottest beschrieben, worin die Enzymprotein-Antikörper-Trübung nephelometrisch serienmäßig bestimmt wird. Im Hefehomogenat sowie im Überschuß an Fremdprotein (menschliches Blutserum) kann mit dieser Methode in einem Gesamtvolumen von 0,40 ml 0,3–0,6 µg und mehr Enzymprotein mit einem mittleren Fehler von ± 4% gemessen werden.

Precipitating antibodies to alcoholdehydrogenase (Alcohol: NAD oxidoreductase E. C. 1.1.1.1) from yeast and horse liver were used in a microtest for serial measurement of the turbidity caused by the enzyme-protein-antibody-reaction in vitro. With this method and a mean error of ± 4%, 0,3 to 0,6 µg of enzyme protein and more per 0,40 ml can be measured in yeast homogenate as well as in the presence of excess foreign protein (human blood serum).

Enzyme werden im allgemeinen mit Hilfe ihrer Reaktionsgeschwindigkeit (Aktivität) unter definierten Standardbedingungen gemessen. Hierbei wird die Enzymquantität nur insofern berücksichtigt, als diejenige Enzymmenge bestimmt wird, die 1 µMol Substrat pro Min. unter jenen Bedingungen umsetzt (1). Für die heutige Enzymchemie sind jene Meßbedingungen bei der Bestimmung von allosterisch oder induktiv beeinflusster Enzymaktivität ungenügend: Eine z. B. in einem Gewebehomogenat erhöhte oder verminderte Enzymaktivität kann auf eine quantitative Vermehrung oder Verminderung des Enzymproteins oder aber auf eine allosterische Steigerung oder Hemmung der Enzymaktivität zurückgeführt werden. Beide Phänomene lassen sich durch die Messung der Reaktionsgeschwindigkeit unter Standardbedingungen nicht voneinander unterscheiden.

Mit Hilfe des nephelometrisch gemessenen Antigen-Antikörperkomplexes, einer für quantitative Messungen von Proteinen des Blutes (2–9) bereits bewährten

Methode haben wir versucht, einen Test zur quantitativen Messung des Enzymproteins aufzubauen, mit dem Enzymprotein im Homogenat oder in Gegenwart hoher Fremdproteinkonzentrationen gemessen werden kann. Durch die simultane Messung von Menge und Aktivität eines Enzyms ist es u. E. möglich, genauere Aussagen über dieses Enzym zu machen als es die bisherigen Methoden erlaubten.

Methodik

Erzeugung von Antikörpern auf Alkoholdehydrogenase²⁾ aus Hefe und Pferdeleber

2 kg schweren, männlichen Kaninchen (Neuseeländer Albinos) werden mit eintägigem Intervall aufeinanderfolgend 0,5, 1,0, 1,5, 2,0 und 4,0 mg Enzymprotein Hefe-Alkoholdehydrogenase (HADH) bzw. Alkoholdehydrogenase aus Pferdeleber (LADH)^{2,3)}

¹⁾ Der Trivialname Alkoholdehydrogenase wird hier gebraucht für das Enzym Alkohol: NAD oxidoreductase EC 1.1.1.1.

²⁾ Bezogen von C. F. Boehringer, Mannheim.

³⁾ Abkürzungen: HADH = Hefe-Alkoholdehydrogenase; LADH = Leber-Alkoholdehydrogenase; EDTA = Äthylendiamintetraessigsäure.

¹⁾ Mit Unterstützung der Deutschen Forschungsgemeinschaft.

i. v. injiziert. Die HADH wurde vor Applikation gegen 0,15M NaCl, 0,002M EDTA (mit KHCO_3 auf pH 6,0 eingestellt) bei 4° dialysiert.

4 Wochen nach der ersten Injektion wird nach zwei weiteren Gaben von HADH ein Teil der Tiere durch Entbluten getötet. Nach Absetzen des Blutkuchens wird das Serum durch niedertouriges Zentrifugieren gewonnen (*Antiserum HADH Charge A*, Titer 4). Andere Tiere werden wie oben mit HADH behandelt, jedoch nach 4-wöchigem Intervall mit 3 aufeinanderfolgenden i. v.-Gaben von je 1,2 mg Enzymprotein geboostert und 2 Monate nach der ersten Injektion wie oben getötet (*Antiserum HADH Charge B*, Titer 16). Da sich auf die oben angegebene Weise keine präzipitierenden Antikörper auf Alkoholdehydrogenase aus Pferdeleber (LADH) erzeugen lassen, wird das LADH-Enzymprotein mit in 0,15M NaCl suspendiertem, sterilen Al_2O_3 -Gel¹⁾ gemischt und i. v. appliziert. Damit lassen sich nach dem unter HADH angegebenen Applikationsmodus 4 Wochen nach Erstinjektion LADH-präzipitierende Antikörper nachweisen. 2 Monate später werden die Tiere entblutet (*Antiserum LADH*, Titer 8).

Nachweis von präzipitierenden Antikörpern gegen HADH und LADH

Ouchterlony-Test

Der Ouchterlony-Plattentest (10) wird bei Zimmertemperatur in 1proz. Agar²⁾ durchgeführt, welcher in Veronalpuffer pH 8,6 (0,025M Natrium-diäthylbarbiturat, 0,005M Diäthylbarbitursäure, 0,025M Natriumacetat, Ionenstärke $\mu = 0,05$) oder in 0,05M Triäthanolaminpuffer pH 7,4 gelöst war. Zur Titerbestimmung der Antisera wird eine konstante Menge Antigen (HADH, LADH) gegen 0,03 ml Antiserum aufgetragen, das 1:1, 1:2, 1:4 usw. mit 0,15M NaCl verdünnt worden war. Bei Angabe des Titers wird diejenige Serumverdünnung angegeben, bei der eine gut sichtbare Präzipitationslinie beobachtet wird.

Immunelektrophorese

Die Immunelektrophorese nach GRABAR (11) und SCHEIDEGGER (12) wird mit einer LKB-Apparatur (LKB 6800 A) in 1proz. Agar²⁾ durchgeführt, welcher in Veronalpuffer pH 8,6 (s. o.) oder in 0,05M Triäthanolaminpuffer pH 7,4 gelöst war. Laufzeit 45–60 Min. bei 250 V und 4°.

Die Präzipitationslinien werden mit Amidoschwarz 10B (Merck) angefärbt.

Enzymaktivitätshemmtest

Enzymaktivitätshemmtest für HADH: 0,2 ml HADH-Antiserum werden mit 0,2 ml HADH-Lösung ($\cong 6 \mu\text{g}$ Enzymprotein mit 0,15M NaCl, 0,002M an EDTA, verdünnt) 120 Min. bei 37° und 23 Stdn. bei 1° inkubiert.

In gleicher Weise werden folgende Kontrollen angesetzt:

- 0,2 ml HADH-Lösung (s. o.) mit 0,2 ml Serum vom unbehandelten Kaninchen,
- 0,2 ml HADH-Antiserum mit 0,2 ml 0,15M NaCl, 0,002M an EDTA,
- 0,2 ml Serum vom unbehandelten Kaninchen mit 0,2 ml 0,15M NaCl, 0,002M an EDTA.

Verschiedene Zeiten nach Vereinigung von Antiserum und Antigen wird jeweils 0,01 ml aus dem Ansatz entnommen. Die enzymatische Aktivität wird im Photometer Eppendorf bei 334 nm und 37° in einer Thermoküvette der Schichtdicke $d = 1$ cm gemessen.

Der Ansatz für den UV-Test enthält: 0,01 ml Probe, 0,02 ml 0,1M NAD³⁾ und 1,97 ml Puffer-Substrat-Gemisch (250 ml 0,06M $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ -Puffer pH 8,5 und 50 ml 2M Äthanol vereinigt) (13).

¹⁾ Bezogen von Behringwerke, Marburg.

²⁾ Special Agar Noble, Difco Laboratories, Detroit, USA.

³⁾ Die Testsubstanzen wurden von den Firmen C. F. Boehringer, Mannheim, und E. Merck, Darmstadt, bezogen.

In gleicher Weise wird die Aktivität der Kontrollen bestimmt. Von der jeweils gemessenen Aktivität des Ansatzes bzw. der Kontrolle a) wird die der Kontrollen b) und c) subtrahiert.

Eine Enzymeinheit ist diejenige Menge HADH, die unter obigen Bedingungen 1 μMol Äthanol pro Min. umsetzt.

Enzymaktivitätshemmtest für LADH: 0,1 ml LADH ($\cong 10 \mu\text{g}$ Enzymprotein in 0,02M Phosphatpuffer pH 7,0 gelöst) werden mit 0,2 ml LADH-Antiserum 120 Min. bei 37° und 24 Stdn. bei 1° inkubiert.

In gleicher Weise werden folgende Kontrollen angesetzt:

- 0,1 ml LADH (s. o.) mit 0,2 ml Serum vom unbehandelten Kaninchen,
- 0,2 ml LADH-Antiserum mit 0,1 ml 0,02M Phosphatpuffer pH 7,0,
- 0,2 ml Serum vom unbehandelten Kaninchen mit 0,1 ml 0,02M Phosphatpuffer.

Verschiedene Zeiten nach Vereinigung von Antiserum und Antigen wird jeweils 0,10 ml aus Ansatz bzw. Kontrollen entnommen und die Enzymaktivität wie oben gemessen.

Der Ansatz für den UV-Test enthält: 0,10 ml Probe, 0,10 ml 0,02M NAD³⁾, 0,10 ml Äthanol p. a. und 2,7 ml 0,1M Glycin-NaOH-Puffer pH 9,6 (14). Die Enzymaktivität der Kontrollen b) und c) wird von der jeweiligen Aktivität des Ansatzes bzw. der Kontrolle a) subtrahiert. Eine Enzymeinheit ist diejenige Menge LADH, die unter obigen Bedingungen 1 μMol Äthanol pro Min. umsetzt.

Nephelometrische Enzymproteinmessung

Aufstellung von Eichkurven für HADH

Die bei der Vereinigung von Enzymprotein mit spezifischem Antikörper auftretende Trübung wird im Photometer Eppendorf bei 334 nm in einer Thermoküvette¹⁾ der Schichtdicke $d = 1$ cm bei 37° in folgendem Ansatz gemessen:

Zu 0,2 ml Antiserum der Charge A wird die zu 2,0 ml Gesamtvolumen benötigte Menge an 0,15M NaCl, 0,002M an EDTA, zugegeben und nach Mischen die Reaktion mit 0,6–27,0 μg HADH in 0,15M NaCl, 0,002M an EDTA, gelöst, in der Küvette gestartet. Der Blindwert (Ansatz ohne HADH) wird von der jeweiligen Extinktion abgezogen.

Da die meßbare Extinktionsänderung in einem Gesamtvolumen von 2,0 ml gering und außerdem die Bildung des Antigen-Antikörperkomplexes durch EDTA gehemmt werden kann (15), haben wir das Gesamtvolumen auf 0,35 ml reduziert und EDTA weglassen.

In folgendem Ansatz werden 0,2 ml Antiserum Charge B mit 0,15M NaCl unter Berücksichtigung der zugegebenen HADH-Menge (0,15–9,0 μg), durch die die Reaktion in der Küvette bei 25° ausgelöst wird, auf 0,35 ml Gesamtvolumen aufgefüllt. Im gleichen Ansatz wird der Einfluß verschiedener NaCl-Konzentrationen (0,015M und 1,5M) auf die Bildung des Antigen-Antikörperkomplexes untersucht.

Messung von HADH-Enzymproteinen in Serum und Hefe-Homogenat

Hierzu wird HADH-Antiserum Charge A in folgendem Ansatz verwendet: Zu 0,1 ml HADH-Antiserum wird die für ein Gesamtvolumen von 0,40 ml erforderliche Menge an 0,15M NaCl gegeben und die Reaktion nach Mischen mit 0,15–3,0 μg HADH zur Aufstellung einer Eichkurve oder mit 0,02 ml Hefe-Homogenat in der 1-cm-Küvette bei 25° ausgelöst und bei 366 nm gemessen¹⁾. Die in diesem Ansatz zur Verfügung stehenden 0,3 ml Testvolumen werden für die Messung von HADH-Enzymproteinen in Gegenwart von Fremdproteinen (Blutserum vom Menschen) verwendet. Die Zusammensetzung der Ansätze zur Messung von HADH-Enzymproteinen in Serum und Hefe-Homogenat sind aus den Tabellen 1 und 2 zu ersehen.

¹⁾ Temperierbare Küvettenwechsellautomatik für 6 Kleinküvetten mit angeschlossener Schreiber (lineare Extinktionsregistrierung), Rechteckblende 1770 oder Ringblende 1775 des Photometers EPPENDORF.

Anfertigung von Eichkurven für LADH

Die nephelometrische Enzymproteinmessung von LADH erfolgt bis 334 nm und 25° nach dem gleichen Prinzip im folgenden Ansatz:

Zu 0,2 ml LADH Antiserum wird die für ein Gesamtvolumen von 0,35 ml erforderliche Menge an 0,15M NaCl gegeben und die Reaktion mit 0,25—6 µg LADH in der 1-cm-Küvette ausgelöst¹⁾. Im gleichen Ansatz wird der Einfluß verschiedener NaCl-Konzentrationen (0,015M und 1,5M) auf die Bildung des Antigen-Antikörperkomplexes untersucht.

Leerwert

Da die Extinktion des Leerwertes (Ansatz ohne Antigen) trotz Zentrifugierens der verwendeten Lösungen in einem Gesamtvolumen von 0,35 bzw. 0,40 ml für 0,2 bzw. 0,1 ml hämolysefreies

Tab. 1

Nephelometrische Messung des Enzymproteins von Alkoholdehydrogenase in Hefehomogenat (28 IU (37°)/mg Biuretprotein). Eingesetzt werden 0,02 ml Homogenat \pm 0,145 IU \pm 0,69 µg Enzymprotein des Eichpräparates. Gesamtvolumen 0,40 ml, 366 nm, d = 1 cm, 25°. Die Reaktion wird in der Küvette mit 0,02 ml Homogenat ausgelöst. Doppelbestimmung

	E_{366} nach 50 Min. Inkubation	E_{366} nach 70 Min. Inkubation
Eingesetzt: 0,69 µ Enzymprotein (rechnerisch ermittelt)		
Leerwert a): 0,10 ml Antiserum Charge A 0,30 ml 0,15M NaCl	0,013	0,018
Leerwert b): 0,02 ml Homogenat 0,38 ml 0,15M NaCl	0,014	0,017
Probe: 0,10 ml Antiserum Charge A 0,28 ml 0,15 M NaCl 0,02 ml Homogenat	0,093	0,101
Probe — Leerwerte a) und b):	0,066	0,066
Gefunden: 0,82 bzw. 0,73 µg Enzymprotein		

Tab. 2

Nephelometrische Messung des Enzymproteins der Hefealkoholdehydrogenase (HADH) in Blutserum vom Menschen. Gesamtvolumen 0,40 ml, 366 nm, d = 1 cm, 25°. Inkubationszeit 50 Min. Die Reaktion wird mit 0,10 ml Antiserum in der Küvette ausgelöst

	E_{366} nm	
Eingesetzt: 0,3 µg HADH-Enzymprotein		
Leerwert a): 0,10 ml Antiserum Charge A 0,20 ml Blutserum vom Menschen 0,10 ml 0,15M NaCl	0,104	
Leerwert b): 0,01 ml HADH 0,20 ml Blutserum vom Menschen 0,19 ml 0,15M NaCl	0,022	
Probe: 0,01 ml HADH 0,09 ml 0,15M NaCl 0,20 ml Blutserum vom Menschen 0,10 ml Antiserum Charge A	0,149	
Probe — Leerwert a) und b)	0,023	
gefunden: 0,29 µg HADH-Enzymprotein		
Eingesetzt: 0,6 µg HADH-Enzymprotein		
Leerwert: 0,02 ml HADH 0,20 ml Blutserum vom Menschen 0,08 ml 0,15M NaCl 0,10 ml Kaninchennormalserum	A	B
Probe: 0,02 ml HADH 0,20 ml Blutserum vom Menschen A bzw. B 0,08 ml 0,15M NaCl 0,10 ml Antiserum Charge A	0,131	0,059
Probe — Leerwert:	0,051	0,047
gefunden: 0,64 bzw. 0,59 µg HADH-Enzymprotein		

¹⁾ Temperierbare Küvettenwechselautomatik für 6 Kleinküvetten mit angeschlossenem Schreiber (lineare Extinktionsregistrierung), Rechteckblende 1770 oder Ringblende 1775 des Photometers EPENDORF.

Antiserum bei einer Inkubationstemperatur von 37° steil ansteigt, wird diese auf 25° herabgesetzt und die bei dieser Temperatur verlangsamt Antigen-Antikörperreaktion in Kauf genommen. Weitere Versuche, die Extinktion des Leerwertes zu erniedrigen (Filterieren, Inkubation bei 56° mit anschließendem Filterieren, Ultrazentrifugation des Antiserums), zeitigten nicht den gewünschten Erfolg.

Ergebnisse

Erzeugung und Nachweis von Antikörpern Alkoholdehydrogenase aus Hefe (HADH)

8 Tage nach der ersten Injektion lassen sich immunoelektrophoretisch und im *Ouchterlony*-Test bereits HADH-

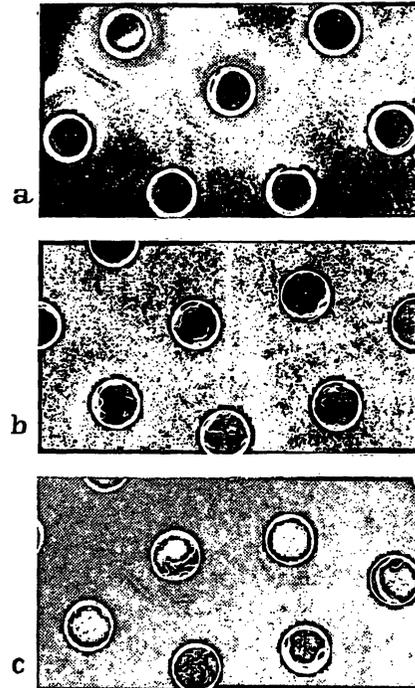


Abb. 1

Ouchterlony-Platten-Test in 1proz. Agar in Veronalpuffer pH 8,6
Obere Löcher: Antigen: a) und b) Hefealkoholdehydrogenase (HADH), c) Leberalkoholdehydrogenase (LADH)
Untere Löcher: Antiserum: a) HADH-Antiserum Charge A, b) HADH-Antiserum Charge B, c) LADH-Antiserum Einzelheiten s. Text



Abb. 2

Immunelektrophorese verschiedener Alkoholdehydrogenasen in 1proz. Agar, 0,05M Triäthanolamin-Puffer pH 7,4
Im Startloch war: a) und b) Hefealkoholdehydrogenase (HADH), c) Leberalkoholdehydrogenase (LADH)
In der Mittelrinne war: a) HADH-Antiserum Charge A, b) HADH-Antiserum Charge B, c) LADH-Antiserum Einzelheiten s. Text

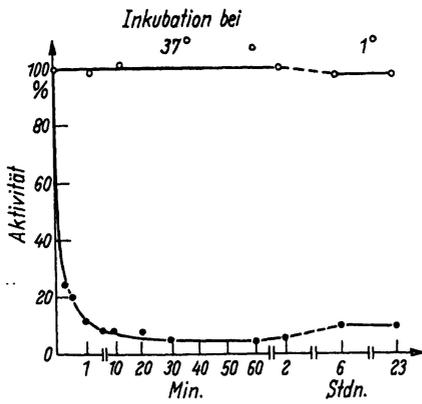


Abb. 3

Hemmung der Aktivität der Hefealkoholdehydrogenase durch ihr spezifisches Antiserum *in vitro*

Testansatz s. Methodik

- Aktivität ohne Antiserum
- Aktivität mit Antiserum

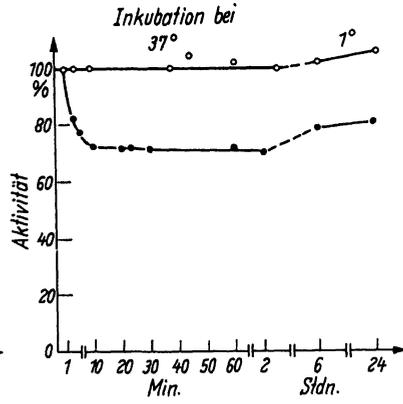


Abb. 4

Hemmung der Aktivität der Alkoholdehydrogenase aus Pferdeleber durch ihr spezifisches Antiserum *in vitro*

Testansatz s. Methodik

- Aktivität ohne Antiserum
- Aktivität mit Antiserum

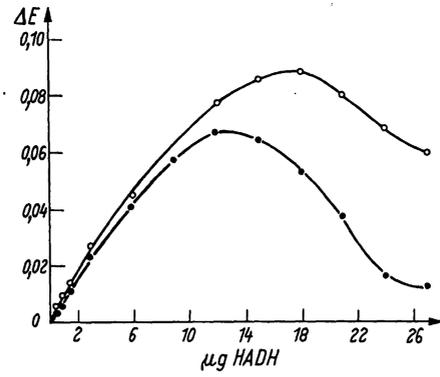


Abb. 5

Nephelometrische Messung des Enzymproteins der Hefealkoholdehydrogenase (HADH)

Gesamtvolumen 2,0 ml, 0,2 ml HADH-Antiserum Charge A, d = 1 cm, 334 nm, 37°, 0,015M NaCl 0,002M an EDTA

- Inkubationszeit 5 Min.
- Inkubationszeit 30 Min.

präzipitierende Antikörper im Kaninchenblutserum nachweisen, jedoch haben diese Seren noch niedrige Titer. 1 Monat nach der ersten Injektion gewonnene Seren mit einem Titer von 4 (Charge A) zeigen im *Ouchterlony*-Test und in der Immunelektrophorese eine Präzipitationslinie (Abb. 1 u. 2). Geboosterte Seren (Charge B) weisen im *Ouchterlony*-Test 3 Präzipitationslinien (zwei davon sind bis zur Verdünnung 1 : 4 sichtbar, Abb. 1), immunelektrophoretisch 4—5 Linien (Abb. 2) auf.

Alkoholdehydrogenase aus Pferdeleber (LADH)

Das nach der angegebenen Methode gewonnene Antiserum mit einem Titer von 8 gibt mit LADH sowohl im *Ouchterlony*-Test als auch in der Immunelektrophorese eine Präzipitationslinie (Abb. 1 u. 2).

Kreuzreaktionen (HADH-Antiserum Charge A und B gegen LADH, LADH-Antiserum gegen HADH) werden weder immunelektrophoretisch noch im *Ouchterlony*-Test beobachtet.

Hemmung der Enzymaktivität der HADH und LADH durch spezifische Antiseren

Hefealkoholdehydrogenase (HADH)

0,2 ml HADH-Antiserum der Charge A und B hemmen 0,3—6 μg HADH innerhalb 30 Min. um mehr als 91% der Ausgangsaktivität (Abb. 3). In den ersten 60 Sek. nach Vereinigung von Enzym und Antiserum sind bereits bis zu 90% der Ausgangsaktivität gehemmt. Jedoch wird die Enzymaktivität nie vollständig gehemmt, weder in Inkubationsansätzen bis zu 2 Stdn. bei 37° noch bei 1° nach 23 Stdn. Doppelbestimmungen zeigen gut übereinstimmende Werte.

Pferdeleberalkoholdehydrogenase (LADH)

0,2 ml spezifisches Antiserum hemmen 10 μg LADH-Enzymprotein um 30% der Ausgangsaktivität (Abb. 4).

Die doppelte Enzymmenge wird unter den gleichen Bedingungen nur um 10% gehemmt. Die Zeit, die bis zum Eintritt der größtmöglichen Enzymhemmung benötigt wird, ist etwa 10mal so lang wie beim HADH-Versuch.

Nephelometrische Enzymproteinmessung

Eichkurven für HADH

Bei einem konstanten Ansatzvolumen von 2,0 ml verläuft die Extinktionszunahme bei einer Inkubationsdauer von 5 bzw. 30 Min. zwischen 0,6 und 3,0 μg HADH als Antigen und 0,2 ml Antiserum Charge A linear und erscheint für quantitative Enzymproteinbestimmungen geeignet (Abb. 5). Größere Mengen von HADH (Antigen-Überschuß) bewirken eine Verminderung der Extinktion: Die Immunpräzipitate werden nach 5 Min. Inkubationsdauer bei 12 μg bzw. nach 30 Min. Inkubationsdauer bei 18 μg wieder löslicher, jedoch nach verschieden langer Inkubation in unterschiedlicher Weise (Abb. 5).

Ein konzentrierterer Ansatz (0,35 ml Gesamtvolumen) bringt, wie erwartet, eine bessere Extinktionsausbeute. Die Abhängigkeit von der Inkubationszeit und der Antigenmenge bei konstantem Antiserumvolumen (Antiserum der Charge B) ist in Abbildung 6 zu sehen. Der Extinktionszuwachs ändert sich nach der 50. Inkubationsminute für 0,3—4,5 μg HADH in 0,15M NaCl wenig, für 6—9 μg HADH-Enzymprotein wird das Extinktionsmaximum bereits nach der 30. bzw. 40. Inkubationsminute erreicht. Für die Salzkonzentrationen 0,015M und 1,5M NaCl werden ähnlich verlaufende Kurven erzielt (vgl. Abb. 10 für LADH), jedoch wird in 1,5M NaCl das Extinktionsmaximum bereits nach der 40. Inkubationsminute für alle eingesetzten Enzymproteinmengen beobachtet. In den Kurven (Abb. 6—11) stellen die jeweiligen Werte Mittelwerte aus 2—4 Einzelmessungen dar.

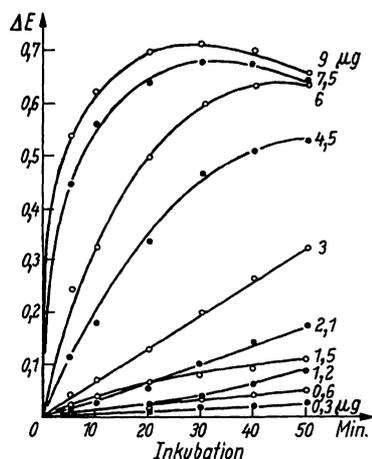


Abb. 6

Nephelometrische Messung des Enzymproteins der Hefealkoholdehydrogenase (HADH) in Abhängigkeit von der Inkubationszeit

Gesamtvolumen 0,35 ml, 0,15M NaCl, 0,2 ml Antiserum Charge B, $d = 1$ cm, 334 nm, 25° (s. Methodik)

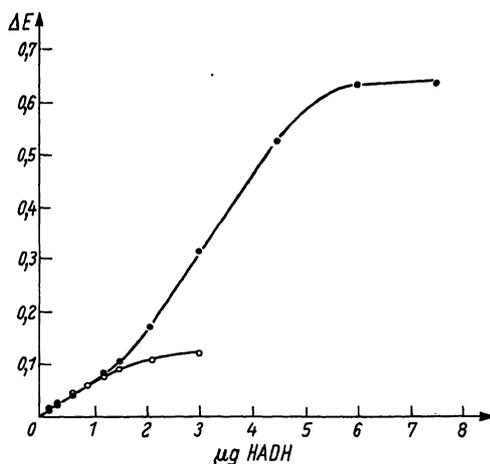


Abb. 7

Nephelometrische Messung des Enzymproteins der Hefealkoholdehydrogenase (HADH)

●—● Gesamtvolumen 0,35 ml, 0,15M NaCl, 0,2 ml Antiserum Charge B, 334 nm
○—○ Gesamtvolumen 0,40 ml, 0,15M NaCl, 0,1 ml Antiserum Charge A, 336 nm, 25°, $d = 1$ cm (s. Methodik)

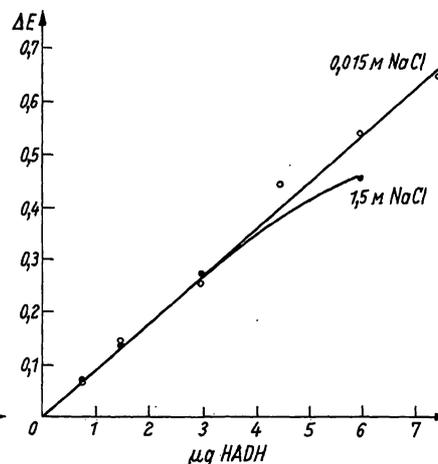


Abb. 8

Nephelometrische Messung des Enzymproteins der Hefealkoholdehydrogenase (HADH) in verschiedenen Salzkonzentrationen

●—● 1,5M NaCl
○—○ 0,015M NaCl
Gesamtvolumen 0,35 ml, 0,2 ml Antikörper Charge B, $d = 1$ cm, 334 nm, 25° (s. Methodik)

Zur Aufstellung von Eichkurven werden für 0,15M und 0,015M NaCl die Extinktionen der 50. Inkubationsminute gewählt, für 1,5M NaCl diejenigen der 40. Inkubationsminute (Abb. 7 u. 8).

Die Eichkurve mit *HADH-Antiserum Charge B* setzt sich in 0,15M NaCl reproduzierbar aus zwei Kurven unterschiedlichen Anstiegs zusammen (Abb. 7): Im Bereich von 0,15 μ g bis 2 μ g HADH hat 1 μ g die Extinktion $E_{d=1\text{ cm}}^{334\text{ nm}} = 0,076 \pm 0,004$, zwischen 2 μ g und 5 μ g HADH $E = 0,108 \pm 0,008$. Der Unterschied ist signifikant ($p = 0,001$, t-Test). Die durchschnittliche Extinktion für 1 μ g HADH errechnet sich hieraus mit $E_{d=1\text{ cm}}^{334\text{ nm}} = 0,089 \pm 0,017$.

Für die Salzkonzentrationen 0,015M und 1,5M NaCl ändert sich diese Extinktion nicht: Sie beträgt für beide NaCl-Konzentrationen $E_{d=1\text{ cm}}^{334\text{ nm}} = 0,091 \pm 0,008$ pro 1 μ g HADH, nach der 50. bzw. 40. Inkubationsminute gemessen. Im Gegensatz zur 0,15M NaCl-Eichkurve verlaufen diejenigen der 0,015M bzw. 1,5M NaCl-Konzentrationen linear (Abb. 8).

Im Gegensatz zum HADH-Antiserum (Charge B) zeigt die Eichkurve mit *HADH-Antiserum Charge A* in 0,15M NaCl einen linearen Kurvenverlauf zwischen 0,15 und 1 μ g HADH-Enzymprotein, eine zusammengesetzte Kurve ist nicht zu sehen (Abb. 7). Die Extinktion für 1 μ g HADH beträgt $E_{d=1\text{ cm}}^{366\text{ nm}} = 0,080 \pm 0,007$ für die 50. Inkubationsminute und $E = 0,090 \pm 0,009$ für die 70. Minute.

Eichkurven für LADH

Die Abhängigkeit der Extinktion von Inkubationszeit, Antigenmenge und Salzkonzentration bei konstantem Antiserumvolumen ist in den Abbildungen 9 und 10 zu sehen. Das Extinktionsmaximum wird für die einge-

setzten Enzymproteinmengen in 0,15M und 0,015M NaCl nach der 40. Inkubationsminute erreicht, in 1,5M NaCl für höhere Konzentrationen an LADH bereits nach der 20. bis 30. Inkubationsminute (Abb. 10). Die Extinktion für 1 μ g LADH beträgt in 0,15M NaCl $E_{d=1\text{ cm}}^{334\text{ nm}} = 0,127 \pm 0,003$, in 0,015M NaCl $E_{d=1\text{ cm}}^{334\text{ nm}} = 0,179 \pm 0,008$ und in 1,5M NaCl $E_{d=1\text{ cm}}^{334\text{ nm}} = 0,150 \pm 0,008$ nach der 40. Inkubationsminute (Abb. 11). Die mittleren Extinktionswerte für 1 μ g LADH in den 3 NaCl-Konzentrationen unterscheiden sich untereinander signifikant ($p < 0,001$, t-Test).

Messung von HADH-Enzymprotein im Hefehomogenat

In einem in 0,5M Glycyl-Glycin-Puffer pH 7,4 extrahierten und bei 3000 U./Min. abzentrifugierten Hefehomogenat mit einer HADH-Aktivität von 28 IU (37°)/mg Biuretprotein (entsprechend 133,4 μ g Enzymprotein des Eichpräparates, rechnerisch ermittelt) werden 143,2 μ g HADH-Enzymprotein nephelometrisch gemessen (Tab. 1). Hierzu werden allerdings längere Inkubationszeiten erforderlich.

Messung von HADH-Enzymprotein in Serum

In Gegenwart eines Überschusses an Fremdprotein werden mit Hilfe der nephelometrischen Enzymproteinmessung 0,3 μ g und 0,6 μ g HADH mit guter Ausbeute und einem mittleren Fehler von $\pm 4\%$ wiedergefunden. (Tab. 2). Die Enzymaktivität der HADH bleibt in Gegenwart von Serum vom Menschen unbeeinflusst.

Einfluß der Wellenlänge auf die Extinktionsausbeute

Das Messen der Trübung bei anderen Wellenlängen ergibt eine deutliche Verminderung der Ausbeute: Setzt man die bei 334 nm gemessene Extinktion gleich 100%,

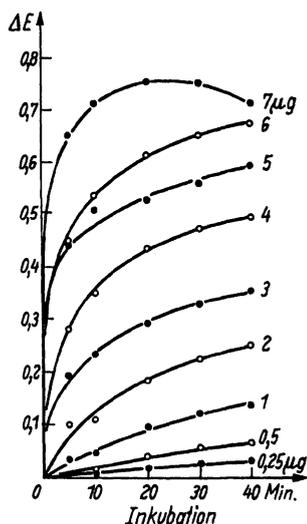


Abb. 9

Nephelometrische Messung des Enzymproteins der Leberalkoholdehydrogenase (LADH) in Abhängigkeit von der Inkubationszeit und der NaCl-Konzentration
Gesamtvolumen 0,35 ml, 0,15M NaCl, 0,2 ml Antiserum, d = 1 cm, 334 nm, 25° (s. Methodik)

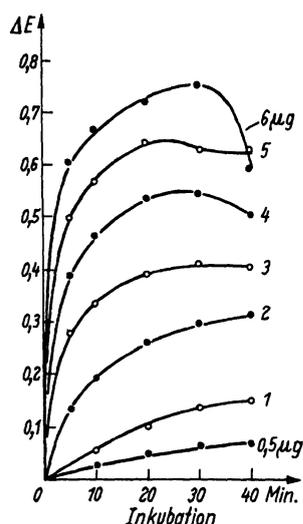


Abb. 10

Nephelometrische Messung des Enzymproteins der Leberalkoholdehydrogenase (LADH) in Abhängigkeit von der Inkubationszeit und der NaCl-Konzentration
Gesamtvolumen 0,35 ml, 1,5M NaCl, 0,2 ml Antiserum, d = 1 cm, 334 nm, 25° (s. Methodik)

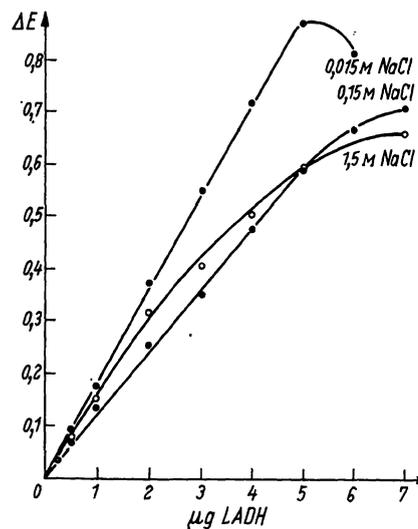


Abb. 11

Nephelometrische Messung des Enzymproteins der Leberalkoholdehydrogenase (LADH) in verschiedenen NaCl-Konzentrationen

Gesamtvolumen 0,35 ml, 0,2 ml Antiserum, d = 1 cm, 334 nm, 25° (s. Text)

so werden bei 366 nm 84%, 436 nm 50%, 492 nm 37%, 546 nm 35% und bei 578 nm 32% dieses Wertes gemessen.

Diskussion

Die Hemmung der Aktivität der Alkoholdehydrogenase aus Hefe (HADH) durch spezifische Antikörper ist bereits bekannt (16—19). Obwohl bei Antikörperüberschuß bereits 20 Sek. nach der Vereinigung von HADH mit dem spezifischen Antikörper mehr als 70% ihrer Aktivität gehemmt wird, scheint die Bindung des Antikörpers nicht an den aktiven Zentren des Enzyms stattzufinden (18).

Die Aktivität der Alkoholdehydrogenase aus Pferdelieber (LADH) wird durch spezifische Antikörper weit weniger gehemmt. Es erscheint uns deshalb unangebracht, mit Hilfe der Entaktivierung von Enzymaktivitäten durch spezifische Antikörper einen Test zur Messung des Enzymproteins aufzubauen.

Die Messung von Proteinen im Blutserum mit Hilfe ihres präzipitierenden Antigen-Antikörper-Komplexes ist seit langem bekannt (5, 6, 20—29) und mit der verbesserten Darstellung von Reinproteinen vervollkommen worden (7—9, 24).

Die gute Übereinstimmung bei diesen Untersuchungen zwischen dem nach HEIDELBERGER und KENDALL bestimmten N-Gehalt im Präzipitat mit der nephelometrisch gemessenen Antikörper-Antigen-Menge (8, 9) veranlaßten uns, die bei der Vereinigung von Enzymprotein und Antikörper entstehende Trübung im Photometer Eppendorf in einem Serien-Mikro-Test zur Erfassung von Enzymproteinen der HADH und LADH aufzubauen.

Bei der Aufstellung von Eichkurven für HADH-Enzymprotein ergeben zwei verschiedene Antiseren (ein nicht geboostertes mit niedrigem Titer und ein geboostertes mit hohem Titer) *unterschiedliche* Eichkurven: Beide Seren zeigen in einem Bereich zwischen 0,15 μ g und 1,0 μ g Enzymprotein identische Extinktionen und einen linearen Kurvenverlauf, bei höheren Enzymkonzentrationen steigt die mit dem *geboosterten* Serum erlangte Eichkurve *steil* an, während diejenige mit dem *nicht geboosterten* Antiserum *relativ flach* verläuft (Abb. 7). Die mit dem geboosterten Antiserum gewonnene Eichkurve setzt sich reproduzierbar aus zwei Kurven unterschiedlichen Anstiegs zusammen. Da dieses Serum im *Ouchterlony*-Test und in der Immunelektrophorese gegenüber HADH 3 bzw. 4 verschiedene, nicht ineinander übergehende Präzipitationslinien zeigt, was entweder auf Isoenzyme der HADH (30, 31, 33) oder aber auf Verunreinigungen des Enzympräparates, die beim Boostern besonders stark herauskommen, zurückgeführt werden kann, ließe sich die aus zwei Kurven zusammengesetzte HADH-Eichkurve in 0,15M NaCl insofern hierauf zurückführen, als bei niedrigeren Konzentrationen an HADH sich jene Störfaktoren infolge ihrer viel geringeren Menge nicht bemerkbar machen würden. Dieses Phänomen der zusammengesetzten Eichkurve ist jedoch abhängig von der NaCl-Konzentration, in der die Antigen-Antikörperreaktion stattfindet: In 0,015M und 1,5M NaCl werden nur *einfach-lineare* Eichkurven für HADH gefunden.

Aus den Untersuchungen von NAJJAR und FISHER ist bekannt, daß Kaninchen Antikörper auf HADH-Antikörper-Komplexe bei längeren Immunisierungszeiten bilden. Da verschiedene Salzkonzentrationen jeweils be-

stimmte Antigen-Antikörper-Komplexe zum Ausfällen bringen (32, 2—4), nehmen wir an, daß die in 0,15M NaCl gefundene, zusammengesetzte Eichkurve auf den sich bei höheren Antigen-Antikörper-Konzentrationen bemerkbar machenden (Antigen-Antikörper)-Antikörper-Komplex zurückzuführen ist, der in 0,015M bzw. in 1,5M NaCl nicht in dem gleichen Ausmaß gebildet werden dürfte.

Auch die bei der LADH-Antikörperreaktion beobachteten, in verschiedenen NaCl-Konzentrationen unterschiedlichen Eichkurven dürften auf verschiedenartige Löslichkeit des Antigen-Antikörperkomplexes und möglicherweise auch auf Kopräzipitation zurückzuführen sein.

Um diese möglichen Störreaktionen auszuschalten, haben wir einen Test zur Messung von HADH-Enzym-

protein mit einem ungeboosterten Antiserum aufgebaut und das HADH-Enzymprotein im Hefehomogenat bzw. in Gegenwart von viel Fremdprotein gemessen. Im Hefehomogenat stimmt die aus der Enzymaktivität berechnete Menge an Enzymprotein gut mit der nephelometrisch gefundenen überein. Durch längere Inkubationszeiten (bis 70 Min.) kann die durch Kopräzipitation verursachte Trübung eliminiert werden. In Gegenwart von viel Fremdprotein (Blutserum vom Menschen) wird das eingesetzte HADH-Enzymprotein mit einem mittleren Fehler von $\pm 4\%$ wiedergefunden.

Herrn Prof. Dr. H. HILZ danke ich für wertvolle Anregung, Beratung und Unterstützung bei der Durchführung dieser Arbeit sowie Herrn Dr. H. ECKSTEIN für die Überlassung des Hefehomogenates.

Literatur

1. HESS, B., Enzyme im Blutplasma, Georg Thieme Verlag, Stuttgart (1962). — 2. GOODMAN, M., H. R. WOLFE und S. NORTON, *J. Immunology* 66, 225 (1951). — 3. GOODMAN, M. und H. R. WOLFE, *J. Immunology* 69, 423 (1952). — 4. GOODMAN, M., H. R. WOLFE und R. GOLDBERG, *J. Immunology* 72, 440 (1954). — 5. GOODMAN, M., D. S. RAMSEY, W. L. SIMPSON, D. G. REMPS, D. H. BASINSKI und M. J. BRENNAN, *J. Laborat. Clin. Med., S. Louis* 49, 151 (1957). — 6. GOODMAN, M., D. S. RAMSEY, E. L. SIMPSON und M. J. BRENNAN, *J. Laborat. Clin. Med., S. Louis* 50, 758 (1957). — 7. GOODMAN, M., H. S. NEWMAN und D. S. RAMSEY, *J. Laborat. Clin. Med., S. Louis* 51, 814 (1958). — 8. SCHEIFFARTH, F., H. GÖTZ und H. WARNATZ, *Clin. chim. Acta (Amsterdam)* 3, 535 (1958). — 9. SCHULTZE, H. E. und G. SCHWICK, *Clin. chim. Acta (Amsterdam)* 4, 15 (1959). — 10. OUCHTERLONY, Ö., *Gel-Diffusion Techniques in Immunological Methods*. Blackwell Scientific Publ., Oxford (1964). — 11. GRABAR, P. und P. BURTIN, *Immuno-Elektrophoretische Analyse*. Elsevier Publ. Comp., Amsterdam (1964). — 12. SCHEIDEGGER, J. J., *Internat. Arch. Allergy* 7, 103 (1955). — 13. RACKER, E., in: *Methods in Enzymology* Bd. I, S. 500. Academic Press, New York (1955). — 14. BONNICHSEN, R. K. und N. G. BRINK, in: *Methods in Enzymology*, Hrsg. S. P. Colowick und N. O. Kaplan. Bd. I, S. 495. Academic Press, New York (1955). — 15. NEFF, J. C. und E. L. BECKER, *J. Immunology* 73, 286 (1954). — 16. JOHANNISMEIER, K. und H. REDETZKI, *Biochem. Z.* 326, 515 (1955). — 17. NAJJAR, V. A. und J. FISHER, *Biochim. biophysica Acta (Amsterdam)* 20, 158 (1956). — 18. PFLEIDERER, G., Z. KOPIFAR und D. E. WACHSMUTH, *Biochem. Z.* 341, 239 (1965). — 19. REDETZKI, H. M., *Proc. Soc. exp. Biol. Med.* 98, 120 (1958). — 20. BOYDEN, A., E. BOLTEN und D. GEMEROY, *J. Immunology* 57, 211 (1947). — 21. EISEN, H. N., *J. Immunology* 60, 77 (1948). — 22. GITLIN, D., *J. Immunology* 62, 437 (1949). — 23. GITLIN, D. und H. EDELHOCH, *J. Immunology* 66, 67 (1951). — 24. HAFAERKAMP, O., D. SCHLETWEINGSELL, H. G. SCHWICK und K. STÖRIKO, *Klin. Wschr.* 44, 725 (1966). — 25. HAYDEN, A. R. und E. L. BECKER, *J. Immunology* 85, 591 (1960). — 26. RUBINSTEIN, H. M., *J. Immunology* 73, 322 (1954). — 27. SCHMIDT, W. C., *J. Immunology* 78, 178 (1957). — 28. TENERDY, R. P., *Analyt. Biochem. (New York)* 11, 272 (1965). — 29. TENERDY, R. P. und W. H. SMALL, *Nature (London)* 210, 708 (1966). — 30. WATTS, D. C., C. DOMINGER und E. P. WHITEHEAD, *Biochem. J.* 81, 4p (1961). — 31. WATTS, D. C., und C. DOMINGER, *Analyt. Biochem. (New York)* 3, 489 (1962). — 32. ALADJEM, F. und M. LIEBERMAN, *J. Immunology* 69, 117 (1952). — 33. PAPANBERG, J., J. P. v. WARTBURG und H. AEBI, *Biochem. Z.* 342, 95 (1965).

Dr. T. O. Kleine
2 Hamburg 20, Martinistr. 52