Zur Bestimmung von γ -Aminobuttersäure und Gluta- minsäure in biologischem Material mit Hilfe von Hochspannungs- elektrophorese

ARNE HANSON und WILFRIED
v. STUDNITZ

*Chemisches Zentrallaboratorium d. Allg.
Krankenhauses, Malmö, Schweden*

Bei Untersuchungen im hiesigen Laboratorium über die Glutaminsäure-dekarboxylase im Gehirn ist die Bestimmung von γ -Aminobuttersäure (γ -ABS) und Glutaminsäure (GLTS) aktuell geworden. Die bisher vorliegenden Methoden beruhen entweder auf der Säulenchromatographie oder der Papierchromatographie. Beide Methoden sind relativ zeitraubend und bei einer quantitativen Bestimmung gibt letztere keine zufriedenstellenden Resultate. So waren wir interessiert eine Methode zu finden, die es ermöglicht γ -ABS und GLTS *gleichzeitig* und mit relativer Genauigkeit in kurzer Zeit zu bestimmen. Wichtig war es auch für uns mit relativ kleinen Mengen Ausgangsmaterial auszukommen, da wir als solches Gehirnextrakt verwandten. — So arbeiteten wir eine Methode aus, die mit Hilfe der Hochspannungselektrophorese die von uns gewünschten Kriterien erfüllte.

Methode. Hochspannungselektrophorese nach Wieland und Pfeleiderer¹. Als Träger diente Papier von Macherey & Nagel Nr. 214. Pufferlösung: konz. Ameisensäure: Eisessig : Wasser (15:10:75) v/v. Elektrophoresedauer 75 Min bei einem Spannungsgefälle von 2 100 Volt zwischen den Elektroden (55 Volt/cm). Auftragsstelle 8 cm von der Anode. Wir trugen 0.005–0.03 ml Gewebeertrakt auf (alkoholischer Extrakt eines sauren Gewebeeinkubates). Ein Entsalzen fällt bei den hier verwandten Spannungen weg. Nach einer Elektrophoresezeit von 75 Min ist die GLTS 10.5 cm und die γ -ABS 15.8 cm kathodenwärts gewandert. (Siehe Bild 1.) Nach Trennung wird das Papier bei 75° im Trockenschrank eine halbe Stunde getrocknet, wobei sich die Pufferlösung verflüchtigt. Anschliessend wird das Pherogramm mit einer 0.5 % Ninhydrinlösung in *n*-Butanol, der mit einer Mischung von Pyridin:Eisessig:Was-

Abb. 1. Elektropherogramm einer Standardlösung von γ -Aminobuttersäure und Glutaminsäure (1) und Gehirnextrakt (2). Siehe Text.

ser (10:1:95) pH 6, gesättigt ist, besprüht. Dann wird das Papier für 20 Min vor einem Ventilator bei ca. 40° getrocknet und der Farbentwicklung im Trockenschrank bei 65° für 20 Min überlassen. Nun wird die gebildete Ninhydrinfarbe nach Kawerau und Wieland² in einen Kupferkomplex überführt. Es wurde das Kupferreagens in der Modifikation nach Fischer und Dörfel³ verwandt. Die gebildeten roten Farbflecke werden nach Trocknen im kalten Luftstrom mit einer bestimmten Menge (in unseren Versuchen 4 ml) Methanol eluiert und nach 20 Min im Beckman-Spektrophotometer B bei 504 $m\mu$ in 1 cm-Küvetten gemessen. — Zur Errechnung des Leerwertes wird ein entsprechend grosses Papierstück, das auf die gleiche Art behandelt wurde, eluiert und der erhaltene Extinktionswert von den anderen abgezogen. — Eine bekannte Standardlösung von γ -ABS und GLTS wird — am besten in 3 verschiedenen Konzentrationen — mit pherographiert und entsprechend behandelt. Mit Hilfe der von den Standardlö-

Abb. 2.

sungen erhaltenen Extinktionen (nach Korrektur mit dem Leerwert) werden Eichkurven angefertigt und so die Konzentration an γ -ABS und GLTS in der zu untersuchenden Lösung rechnerisch ermittelt. Beispiel siehe Bild 2. — Sollten in dem zu untersuchenden Material (z.B. Serumextrakt) grössere Mengen Glycin auftreten, so kann es vorkommen, dass in Folge eines "Overloading"-Effektes die γ -ABS nicht klar vom Glycin zu trennen ist. Letzteres hat eine etwas grössere Mobilität als γ -ABS. (Siehe Bild 3 A.) Hier kann man sich weiter helfen in dem man in einem Puffermilieu von pH 3,5 arbeitet. (Puffer: Eisessig:Pyridin:Wasser, 15:1:89, v/v.) Bei gleichen Versuchsbedingungen wie oben erhält man ein Trennungsbild wie im Bild 3 B; Auftragsstelle 12 cm von der Anode. γ ABS wandert 15 und Glycin nur 5 cm zur Kathode. Auch GLTS ist in diesem Milieu gut zu bestimmen und wird bei ihrer kurzen Wanderungsstrecke (1 cm) nicht von anderen Aminosäuren überlagert.

Die Untersuchungen wurden vom Schwedischen Medizinischen Forschungsrat unterstützt.

Abb. 3, A und B.

1. Wieland, Th. und Pfeleiderer, G. *Angew. Chem.* **67** (1955) 257.
2. Kawerau, E. und Wieland, Th. *Nature* **168** (1951) 77.
3. Fischer, F. G. und Dörfel, H. *Biochem. Z.* **324** (1953) 544.

Eingegangen am 16. Juni 1958.

On Light-Induced Phosphorylation in *Rhodospirillum rubrum*

HERRICK BALTSCHIEFFSKY and
MARGARETA BALTSCHIEFFSKY

Wenner-Gren Institute, University of
Stockholm, Sweden

Light-induced phosphorylation (LIP) was described in 1954 by Arnon, Allen and Whatley¹ for plant and by Frenkel² for bacterial systems. Among the concepts about its mechanism are: (1) the phosphorylation reactions are coupled to an electron carrier chain, which recombines the photochemical oxidant (OH) and the