

10 - 100 $\mu\text{g/ml}$ I bzw. 1 - 10 $\mu\text{g/ml}$ II in Urin lagen die Wiederfindungswerte bei $96,8 \pm 2,5\%$ I und $97,8 \pm 1,8\%$ II. — J. Chromatogr. **200**, 245 - 249 (1980). Ital. Schoum S.p.A., Milano (I) W. Czynsz

Field effect transistor sensitive to penicillin. S. Caras and J. Janata.

Best. von Penicillin; Enzymelektroden; Penicillinase-Albumin-Membran. — A feasibility study of an enzyme-coupled field effect transistor has been done. This device was constructed by depositing a co-cross-linked penicillinase-albumin layer over a pH-sensitive field effect transistor. The differential mode of measurement largely eliminates the temperature sensitivity and the effects of ambient pH variation. The new probe has a lifetime of 2 months and time response $\tau_{63} = 25$ s. The range and sensitivity are comparable to the conventional penicillin-sensitive macroelectrodes. The small size of the sensitive gate requires only a minute amount of enzyme ($\sim 2.5 \times 10^{-4}$ IU) which could prove to be an important factor in construction of other enzymatic sensors utilizing more expensive enzymes. — Anal. Chem. **52**, 1935 - 1937 (1980). Dept. Bioengin., Univ. Salt Lake City, UT (USA)

High-performance liquid chromatographic determination of amoxicillin in pharmaceutical dosage forms. M.J. Lebel, W.L. Wilson and G. Lauriault.

Best. von Amoxicillin in Pharmazeut. Produkten; Chromatographie, HPLC. — Zur Bestimmung von Amoxicillin als Substanz und in pharmazeutischen Zubereitungen (homogenisierten Kapseln) wurde ein HPLC-chromatographisches Verfahren ausgearbeitet. Man verwendete einen Spectra-Physics Flüssig-Chromatographen SP 8000 mit SP 8300 UV-Detektor (254 nm) und Datensystem, eine 25 cm x 4,6 mm-Umkehrphasen-Säule mit RP-8, 10 μm -Packung (Brownlee Labs.) und 6% Methanol in 0,05 M Phosphatpuffer pH 5,0 (1,0 ml/min; 30°C) als mobile Phase. Phenoxyyessigsäure diente als innerer Standard, die Proben wurden in Wasser gelöst. Die Linearität des Systems reichte von 0,5 bis 2,5 mg/ml Amoxicillin (0,8 mg/ml Internstandard). Bei injizierten Probenaliquots (Lösung von 2 mg/ml) von 10 μl betrug die rel. Standardabweichung 0,58% bei einer Wiederfindensrate von 93,5%. — J. Chromatogr. **202**, 144 - 147 (1980). Drug Res. Labs., Health Prot. Branch, Tunney's Pasture, Ottawa (CDN) W. Czynsz

DC polarographic and spectrophotometric determination of ampicillin capsules. J.A. Squella, L.J. Nunez-Vergara and M. Aros.

Best. von Ampicillin in Pharmazeut. Produkten; Polarographie/Spektrophotometrie. — Acidic hydrolysis of ampicillin with 1% HCHO in 0.3 N HCl yields a degradation product identified as 2-hydroxy-3-phenyl-6-methylpyrazine. This compound has a well defined UV absorption band at 380 nm and a polarographic wave at -0.55 V vs SCE, which can be used for analytical purposes. Individual capsule assays, composite assays and recovery studies are described. The average recovery values and standard deviations (SD) for UV and polarographic determinations were 99.20% (SD 0.95) and 100.85% (SD 1.09), respectively. — J. Assoc. Off. Anal. Chem. **63**, 1049 - 1051 (1980). Univ. Chile, Dept. Chem. Pharmacol. Phys. Chem., Santiago (RCH)

Rapid determination of 7-acylaminocephem compounds in the presence of 7-aminocephem compounds by means of enterobacter β -lactamase. K. Kato, H. Shirafuji, Y. Yamazaki and T. Takahashi.

Best. von 7-Acylaminocephem-Verbindungen; Enzymatische Analyse. — Unter dem Einfluß von β -Lactamase hydrolysieren die 7-Acyлами-

nocephem-Verbindungen, was eine Lichtabsorptionsabnahme bewirkt. Die spezifische Aktivität des Enzyms beträgt 60 Einheiten/mg Protein. Die Einheit der Aktivität wurde so definiert, daß 1 μM Cephalosporin in 1 min, bei pH 8 und 25°C hydrolysiert wird. — *Arbeitsweise.* Zu 0,1 mM Cephalosporin und 0,05 M Tris-Puffer pH 8 in 2,5 ml Lösung werden 20 μl β -Lactamase-Lösung zugesetzt (für die Acylverbindung 2 Einheit/ml, für die Aminoverbindung 40 Einheit/ml). Die Lichtabsorption wird bei 260 nm gemessen. — Agric. Biol. Chem. **44**, 465 - 466 (1980). Corp. Relat. Office, Takeda Chem. Ind. Ltd., Osaka (J) L. Légradi

Comparison of reversed-phase and adsorption modes of high-performance liquid chromatography for the assay of fat soluble vitamins in multivitamin tablets. D.T. Burns and C. Mackay.

Best. von Vitaminen, fettlös. in Multivitamin-tabletten; Chromatographie, HPLC. — Zur Bestimmung der fettlöslichen Vitamine A-acetat, D₂ und E-acetat in Multivitamin-tabletten werden die Tabletten zunächst nach dem von C. Mackay, J. Tillman und D.T. Burns (Analyst **104**, 626 (1979); vgl. diese Z. **301**, 89 (1980)) beschriebenen Verfahren zur schonenden Freisetzung der fettlöslichen Vitamine behandelt. Unter Zufügung von 4-Hydroxybiphenyl als innerem Standard werden die Vitaminlösungen (in Cyclohexan) auf die Säulen gegeben. Für das Umkehrphasen-Verfahren verwendet man Partisil-10-ODS-Whatman) oder μ Bondapak-C18-Phase (Waters), Elution mit Methanol/Wasser (90:10), 1 ml/min. Die adsorptions-chromatographische Trennung erfolgt an einer Partisil-10-Kieselsäure-Säule (Whatman), Elution mit 1,25% Isopropanol in Cyclohexan, 0,8 ml/min. Das Umkehrphasenverfahren eignet sich zur Bestimmung von Vitamin-A-acetat und -E-acetat, das Adsorptionsverfahren zur Bestimmung von Vitamin D₂ und Prävitamin D₂. — J. Chromatogr. **200**, 300 - 304 (1980). Dept. Anal. Chem., Queen's Univ., Belfast (Nord-Irland) W. Czynsz

3 BIOCHEMISCHE UND KLINISCHE ANALYSE

A new technique for the quicker separation of undamaged microsomes using ascorbic acid. S.K. Jagota and H.M. Dani.

Analyse von Biolog. Material; verbess. Abtrenn. von Mikrosomen. — Microsomes are prepared by treating rat liver post-mitochondrial supernatant with 6 mM ascorbic acid within 20 min. The specific activities of various phosphatases and other integral components remain comparable to those obtained from microsomes prepared by time-consuming ultracentrifugal technique. The method can be used for rapid isolation of hepatic microsomes for studies. — *Procedure.* Mince the livers from ad libitum fed male albino rats of Kasaulti Strain and homogenise in 3 volumes of ST buffer (0.225 M sucrose + 25 mM Tris at pH 7.5) at 0 - 4°C. Centrifuge the homogenate at 10000 g for 20 min at 4°C. Decant the supernatant and dilute with 2.5 volumes of 0.225 M ST buffer and bring to 6 mM concentration with respect to ascorbic acid. Again centrifuge as before, rinse the pellet with 0.225 M ST buffer and resuspend in it before freezing at -20°C . — Curr. Sci. **49**, 649 - 696 (1980). Dept. Biochem., Punjab Univ., Chandigarh (IND) M. Katyal

Separation of human serum proteins by high-speed gel filtration on TSK-Gel G3000SWG. Y. Kato, K. Komiya, H. Sasaki and T. Hashimoto.

Trenn. von Proteinen aus Blutserum; Chromatographie, Gel. – Es wird das Elutions- und Retentionsverhalten menschlicher Serumproteine bei der Gelfiltration an TSK-GEL SW-Säulen beschrieben. 3 ml menschliches Standardserum, 1:4 verdünnt, werden injiziert und mit Elutionskurven abgebildet, wobei in einem Fall die Trennung durch Messung der UV-Extinktion, im anderen durch Immundiffusion detektiert wurde. Es werden getrennt: Albumin, saures α_1 -Glykoprotein, α_2 HS-Glykoprotein, Haptoglobin, α_2 -Macroglobin, Hämoexin, C3c(β_1 A-Globulin), Transferrin, IgG und IgA. – J. High Resolut. Chromatog. 3, 145 (1980). Central Res. Lab., Toyo Soda Manufacturing Co. Ltd., Tonda, Shinnanyo, Yamaguchi (J) E.E.

Melting curves on less than 1 μ g of nucleic acid. K. Henco, G. Steger and D. Riesner.

Schmelzkurven von Nucleinsäuren. – Two types of microcuvettes were developed for the registration of melting curves in normal UV-spectrophotometers. Nucleic acid (0.5 - 1 μ g) is required to determine changes in absorption with an accuracy of 0.1 mA. The quartz cuvette allows the registration of equilibrium melting curves up to 100°C. The other type of cuvette made from gilded brass allows to measure slow temperature jumps up to 80°C and equilibrium melting curves up to 70°C. The time range of ~3 s to several hours is accessible complementing the Eigen/De Mayer temperature-jump technique (1963, in Techniques of Organic Chemistry, Vol. VIII/2, pp. 895 - 1054, Wiley, New York). Temperature jumps of high amplitude as well as jumps to lower temperatures are possible. Examples of measurements on viroids and double-stranded viral RNA are presented. – Anal. Biochem. 101, 225 - 229 (1980). Inst. Org. Chem. Biochem., TH Darmstadt (D)

Analyses of DNA by automated logging and processing of data from the analytical ultracentrifuge. A.H. Reisner.

Anal. von Desoxyribonucleinsäure; Ultrazentrifuge; Datenverarbeitung. – Methods to log data from buoyant-density and zonal-sedimentation velocity centrifugations of DNA in an analytical instrument are described, as well as computer programs to analyze such data. It is simple and quick to determine modal molecular weights of DNA in neutral or alkaline solutions or buoyant densities in CsCl or Cs₂SO₄. An interactive program which simulates the Dupont curve resolver has also proved useful. Correction equations to convert scanner output to true absorbance were developed. – Anal. Biochem. 105, 24 - 31 (1980). CSIRO Genetics Res. Lab., Div. Animal Product., North Ryde, N.S.W. (AUS)

Sequenz-Analyse von Desoxyribonucleinsäuren. L. Jaenicke.

Sequenzanalyse von Desoxyribonucleinsäure; Übersicht. – Die Arbeit gibt eine Übersicht über einige neuere Methoden der Sequenzanalyse von Desoxyribonucleinsäuren: 1. das Maxam-Gilbert-Verfahren; 2. die Sanger-Coulson-Methode; 3. die Sequenzierung von DNA mit kettenabbrechenden Hemmstoffen nach F. Sanger, F. Micklen und A.R. Coulson. – Chemie Labor Betrieb 32, 3 - 8 (1981). Inst. Biochemie, Univ. Köln (D) W. Czysz

Radioenzymatic assay for the acetohydroxy acid synthase-catalyzed synthesis of α -aceto- α -hydroxybutyrate. K.J. Shaw and C.M. Berg.

Best. von Acetylhydroxysäuresynthase; Radioenzymatisches Verfahren. – Ein radioenzymatisches Bestimmungsverfahren für Acetylhydroxysäuresynthasen wird beschrieben. Dieses Verfahren wird zur Untersuchung der Biosynthese von Isoleucin entwickelt. Einer der Isoleucinvorgänger kann durch Kondensation von Pyruvat und

1-[¹⁴C]- α -Keto-butyrat entstehen. Das entstehende [¹⁴C]- α -Acetylhydroxybutyrat setzt nach Ansäuern ¹⁴CO₂ frei. Dieses kann in einem dafür konstruierten Gefäß, das beschrieben ist, aufgefangen werden. Das freigesetzte ¹⁴CO₂ wird dabei auf Oxifluor-CO₂ adsorbiert und kann durch Szintillationszählung bestimmt werden. Die Abhängigkeit der einzelnen Reaktionsschritte von Zeit, pH und Liganden wird untersucht. – Anal. Biochem. 105, 101 - 105 (1980). Biol. Sci. Group, Univ. Connecticut, Storrs, CT (USA) R.H. Sterzel

Assay of L-aromatic amino acid decarboxylase by high performance liquid chromatography. M.D'Erme, M.A. Rosei, A. Fiori and G. Di Stazio.

Best. von Aminosäuredecarboxylase, L-aromat.; Chromatographie, HPLC. – Ein HPLC-Verfahren zur Bestimmung l-aromatischer Aminosäuredecarboxylase wird beschrieben. Als Substrat wird 3,4-Dihydroxyphenylalanin (DOPA) verwendet, welches durch das Enzym zu Dopamin umgewandelt wird. Die Reaktionsprodukte werden flüssigchromatographisch auf einer μ Bondapak C₁₈ Säule, die mit 6×10^{-3} M 1-Octansulfonat beschichtet ist, getrennt. Als mobile Phase wird eine Mischung Methanol/Wasser/Eisessig (25:75:1) verwendet. Bei Verwendung von α -Methyldopamin als Substrat kann eine sekundäre enzymatische Reaktion durch Entstehung des 3,4-Dihydroxyphenylacetons verfolgt werden. Die erhaltenen Werte sind in guter Übereinstimmung mit Radioisotopen-Bestimmungsverfahren. – Anal. Biochem. 104, 59 - 61 (1980). Ist. Chim. Biol., Fac. Farm., Univ. Rom (I) R.H. Sterzel

A method for the localization of glutathione S-transferase isozymes after starch gel electrophoresis. P.G. Board.

Trenn. von Glutathion-S-transferasen aus Gewebe, tierisches; Elektrophorese, Gel; Anfärbeverfahren. – Ein neues Verfahren zur Trennung der verschiedenen Formen von Glutathion-S-transferase aus Ratten- und Menschenlebergewebe durch Elektrophorese auf Stärkegenen sowie deren Lokalisierung auf der Geloberfläche durch ein spezifisches Anfärbeverfahren wird beschrieben. Die Elektrophorese wird bei 5°C mit Tris-EDTA-Borat-Puffer (pH 8.6) mit 4 V/cm durchgeführt. Zur Anfärbung wird ein zweistufiges Verfahren verwendet. Erst wird 1-Chlor-2,4-dinitrobenzol in Ethanol mit reduziertem Glutathion gemischt und in 0,1 M K₃PO₄ (pH 6,5) gelöst. Mit dieser Lösung wird ein Filterpapier gesättigt, welches auf die Gelschnittfläche gelegt wird. Dann wird 40 min bei 37°C inkubiert. Nach Entfernung des Filterpapiers wird mit einer Lösung aus Iod (1% I₂ in KI) und 2% geschmolzenem Agar überschichtet. Es entsteht eine intensive Blaufärbung an den Stellen, wo Glutathion-S-transferase mit 1-Chlor-2,4-dinitrobenzol reagiert hat. Das Verfahren wird für verschiedene Glutathion-S-transferasen eingesetzt. – Anal. Biochem. 105, 147 - 149 (1980). Dept. Human Biol., Australian Nat. Univ., Canberra (AUS) R.H. Sterzel

Fractionation of yeast invertase isozymes and determination of enzymatic activity in sodium dodecylsulfate-polyacrylamide gels. P. Babczinski.

Trenn. von Invertase-Isoenzymen; Elektrophorese, Gel; SDS-Polyacrylamid. – Drei Invertase-Isozyme wurden aus Hefezellmembranen durch Inkubation mit Desoxycholat extrahiert und durch Na-Dodecylsulfat-Polyacrylamidgel-Elektrophorese aufgetrennt. Zur Lokalisierung und Bestimmung der Isozyme bzw. deren Aktivitäten wird eine Reaktionssequenz angewandt, bei der die durch Invertase aus Saccharose gebildete Glucose durch Glucosedehydrogenase unter Bildung von NADH dehydriert wird. NADH wird durch Phenazinmethosulfat reoxidiert, welches wiederum Iodnitrotetrazoliumchlorid zu einem braunroten Formazan-Komplex umsetzt, dessen Intensität mit einem

Gel-Scanner gemessen wird. Zur Vermeidung einer Anomerisierung von Glucose als geschwindigkeitsbestimmenden Schritt wird Mutarotase dem Gemisch beigegeben. Die Färbung ist linear der Zeit, der Protein-Extraktmenge und von der Gegenwart von Saccharose abhängig. Die Methode sollte auch auf andere Glucose-freisetzende Enzyme oder Substanzen, die in Glucose umgewandelt werden können, anwendbar sein. — Anal. Biochem. **105**, 328 - 333 (1980). Botanik I, Fak. Biol. Vorklin. Med., Univ. Regensburg (D) J.B.

Lactate dehydrogenase isoenzymes in the genus *Xenopus*. Comparison of isoelectric focusing and electrophoresis as separation methods. E. Vonwyl.

Analyse von Lactatdehydrogenase-Isoenzymen; Elektrophorese; Isoelektrofokussierung. — Lactat-Dehydrogenase-Isoenzyme-Muster wurden miteinander verglichen, je nach dem sie durch isoelektrische Fokussierung oder konventionelle Elektrophorese erhalten wurden. Dabei wurden insgesamt zehn *Xenopus*-Species einbezogen. Bei der isoelektrischen Fokussierung wurde eine komplexe Bandenfolge mit etwa 22 Einzelbanden erhalten. Im Gegensatz dazu stellt sich das Elektrophorese-Muster erheblich einfacher dar. Optimale Ergebnisse erhält man, wenn beide Methoden kombiniert werden. — Science Tools **27**, 36 - 38 (1980). Stat. Zoolog. experimentale, Univ. Genf, Chene-Bourgeries/Geneva (CH) W. Czysz

Purification of human milk bile salt-activated lipase by cholic acid-coupled sepharose 4B affinity chromatography. C.-S. Wang.

Best. von Lipase in Milch; Chromatographie, Gel; Gallensäure-aktivierbare. — Aus „entrahmter“ menschlicher Milch kann die Gallensäure-aktivierbare Lipase (I) durch Chromatographie an einer Concanavalin A-Sephrose 4B-Kolonne, die I nicht zurückhält und nachfolgender Affinitäts-Chromatographie an einer Cholat-Sephrose 4B-Kolonne und Elution von I von der Kolonne mit Na-Desoxycholat isoliert werden. Nach Aufkonzentrieren durch Druckdialyse wird eine Anreicherung auf das 150fache erreicht. Durch Harnstoff-Na-Desoxycholat-Polyacrylamidgel-Elektrophorese wird ein scheinbares Molekulargewicht von 125000 für die Untereinheit von I ermittelt und eine einheitliche Bande erhalten. Antiserum von I zeigt keine inhibitorische Wirkung gegenüber Lipoproteinlipase, so daß diese immunochemisch von I verschieden ist. I repräsentiert 0,5 - 1% der gesamten Milch-Protein-Masse. — Anal. Biochem. **105**, 398 - 402 (1980). Lab. Lipid Lipoprotein Studies, Okla. Med. Res. Found., Oklahoma City, OK (USA) J.B.

Ultramicrossay of hydrogen peroxide-producing oxidases. M. Le Hir.

Best. von Oxidasen, H₂O₂-bildende; Enzymatische Analyse. — Das hier beschriebene Verfahren zur Ultramikrobestimmung von H₂O₂-bildenden Oxidasen basiert auf der Inhibition der Katalase durch 3-Amino-1,2,4-triazol in Gegenwart von durch die Oxidasen produziertem H₂O₂. Zwischen der Katalase-Inhibition und der Aktivität der Oxidase (Urat-Oxidase und D-Aminosäure-Oxidase) besteht Linearität bis in den pM-Bereich durch Oxidase produzierten H₂O₂. Das entspricht der Bestimmung von wenigen Mikro-Einheiten Urat-Oxidase oder D-Aminosäure-Oxidase, das entspricht weniger als 1 µg gefriergetrockneter Rattenleber oder -niere. Die genauen Arbeitsschritte sind angegeben. — Anal. Biochem. **102**, 233 - 236 (1980). Med. Univ.-Poliklinik, Basel (CH) W. Czysz

A sensitive and versatile chromogenic assay for peroxidase and peroxidase-coupled reactions. T.T. Ngo and H.M. Lenhoff.

Best. von Peroxidase mit Methylbenzothiazolimonhydraton und

Dimethylaminobenzoesäure; Spektralphotometrie. — Zur Bestimmung von Peroxidase sowie für mit Peroxidase gekuppelte Reaktionen wird eine empfindliche und vielseitige colorimetrische Methode beschrieben, bei der in Gegenwart von H₂O₂ aus 3-Methyl-2-benzothiazolimonhydraton und 3-Dimethylaminobenzoesäure eine tief purpurrote Verbindung, wahrscheinlich ein Indamin-Farbstoff gebildet wird, der eine breite Absorptionsbande bei 575 - 600 nm aufweist. Peroxidase kann in pMol-Mengen sowohl über die Reaktionsgeschwindigkeit als auch über eine Festzeitmethode bestimmt werden. H₂O₂ kann bis zu 2 µMol/ml kinetisch gemessen werden. Glucose wird durch Kupplung von Glucoseoxidase mit Peroxidase bestimmt, wobei die H₂O₂-Bildung der Glucose-Konzentration direkt proportional ist. Auf gleiche Weise kann Maltose durch Zusatz von in Glucose aufspaltende α -Glucosidase bestimmt werden. Der Variationskoeffizient der Glucose-Bestimmung liegt bei 2 - 5% nach der Geschwindigkeitsmethode und bei 3 - 10% nach der Festzeitmethode. Vorteile gegenüber bekannten Methoden sind Empfindlichkeit, Vielseitigkeit und die Verwendung nichtcarcinogener Substanzen. — Anal. Biochem. **105**, 389 - 397 (1980). Dept. Mol. Biol. Biochem., Univ. Irvine, CA (USA) J.B.

Peroxidase and hydrogen peroxide detection by a bioenergized method. S.M. de Toledo, M. Haun, E.J.H. Bechara and N. Duran.

Best. von Peroxidase in Blut; Chemolumineszenz. — Die Aktivität von Peroxidase und Hydrogenperoxidkonzentrationen können gemessen werden mit Hilfe eines Chemolumineszenzverfahrens, welches auf der Reduktion von Peroxidase I und II durch Eosin und EDTA beruht. Im Bereich von 10⁻¹² bis 10⁻⁷ M kann Meerrettichperoxidase durch Messung der Lichtemission nach Reduktion der Peroxidase-Verbindung I und II durch Eosin bei pH 6,2 bestimmt werden. Außerdem wird noch 0,5 mM EDTA zugesetzt. Zur Bestimmung des H₂O₂ wird die Reaktion durch Zusatz von Peroxidase eingeleitet und sonst dieselben Reaktionsbedingungen gewählt. Im Bereich von 10⁻⁹ bis 10⁻⁵ M wird eine lineare Eichkurve erhalten. Das überschüssige Eosin wird bei diesem Verfahren während der Reaktion in seinen fluoreszierenden Zustand angeregt. Das Verfahren wird zur Bestimmung der Peroxidaseaktivität in roten Blutzellmembranen und zur H₂O₂-Bildung bei der Glutathionoxidation eingesetzt. — Anal. Biochem. **105**, 36 - 38 (1980). Inst. Quim. Univ. Estadual Campinas, Sao Paulo (BR) R.H. Sterzel

Determination of phosphorylase kinase activity in crude homogenates by affinity chromatography on 5'-AMP sepharose. N. Borregaard and V. Esmann.

Best. von Phosphorylasekinase in Biolog. Proben; Chromatographie, Affinität. — Ein empfindliches Verfahren zur Bestimmung der Phosphorylasekinaseaktivität durch Einbau von ³²P aus [³²P]-ATP in Phosphorylase in Gegenwart anderer Phosphorylierungsreaktionen wird beschrieben. Die Kinasereaktion wird in rohen Homogenaten ausgeführt. Nach Unterbrechung der Reaktion wird ein Teil der Reaktionsmischung zur Bestimmung der Phosphorylasekonversion und der andere Teil für die Analyse auf einer 5'-AMP-Sephrose Säule verwendet. Die Phosphorylase wird in beiden Formen auf der Sepharose festgehalten, während andere phosphorylierte Proteine und [³²P]-ATP ausgewaschen werden. Die Phosphorylase wird dann durch 10 mM AMP eluiert und die entstandene Radioaktivität gemessen. — Anal. Biochem. **105**, 53 - 57 (1980). Dept. Med., Marselisborg Hosp., Arhus (DK) R.H. Sterzel

Electrophoretic analysis of plasminogen activators in polyacrylamide gels containing sodium dodecyl sulfate (SDS) and copolymerized substrates. C. Heussen and E.B. Dowdle.

Analyse von Plasminogen-Aktivatoren; Elektrophorese; PAA-Gel/SDS. — Für die elektrophoretische Analyse von Plasminogen-Aktivatoren in SDS-Polyacrylamid-Gelen wird ein modifiziertes Verfahren vorgeschlagen. Es beruht auf der Beobachtung, daß Gelatine ein empfindliches und brauchbares Substrat für Plasmin darstellt. Wenn man nun Gelatine und Plasminogen während des Ausgießens der Platten in die Matrix des SDS-PAA-Gels copolymerisiert, werden diese während der anschließenden Elektrophorese der Enzymproben zurückgehalten. Sie ergeben damit in-situ-Substrate für die getrennten Banden der Plasminogen-Aktivatoraktivität. Nach der Trennung werden die Gele bei Raumtemperatur in Triton X-100 inkubiert, um SDS zu entfernen und die Enzymaktivität zu regenerieren. Das Verfahren erlaubt die Erfassung von noch 1 mE Urokinase. Außerdem werden Melanoma- und Urokinase-Plasminogen-Aktivatoren von Melanoma- und Urokinase-Typ einwandfrei differenziert. Plasminogen-unabhängige Proteasen können unter Weglassen des Plasminogens aus dem Gel nachgewiesen werden. — *Anal. Biochem.* **102**, 196 - 202 (1980). Dept. Clin. Sci. Immunol., Univ. Med. School, Cape Town, Observatory (ZA) W. Czysz

New fluorogenic substrates for a rat brain proline endopeptidase. W.L. Taylor, P.C. Andrews, C.K. Henrikson and J.E. Dixon.

Best. von Prolinendopeptidase in Gewebe, tierisches; neues fluorogenes Substrat. — Several compounds having the general formula, Z-X-L-propyl-4-methoxy- β -naphthylamide have been examined as substrates for a homogeneous rat brain proline endopeptidase. The compounds examined included X equal to L-Ala, L-His, L-Lys and L-Asp, the latter compound being the poorest substrate of those examined. A simple assay was developed based upon the appearance of the fluorescent product, 4-methoxy- β -naphthylamine. The assay is highly sensitive, continuous and affords the possibility of utilizing the product of the reaction for tissue or subcellular localization of the enzyme. The homogeneous enzyme hydrolyzed each substrate examined. The most favorable kinetic constants were noted with Z-L-Ala, Z-L-His, and Z-L-Lys, Pro-4-methoxy- β -naphthylamide. These substrates show a pH optimum at 8.3 with the homogeneous rat brain endopeptidase. The tissue distribution of the enzyme was examined using each substrate and the highest specific activity was noted in the brain. A monospecific antibody prepared against the homogeneous rat brain enzyme inactivates essentially all enzyme activity in every tissue examined except kidney, where as much as 7% residual activity was noted. — *Anal. Biochem.* **105**, 58 - 64 (1980). Dept. Biochem. Dept. Veterin. Anatomy, Purdue Univ., West Lafayette, IN (USA)

A simple, rapid and sensitive procedure for the assay of endoproteases using Coomassie brilliant blue G-250. M. Saleemuddin, H. Ahmed and A. Husain.

Best. von Enzyme, proteolytisch in Enzympräparaten; Spektralphotometrie. — Ein schnelles kolorimetrisches Verfahren zur Bestimmung proteolytischen Enzyms wird beschrieben. Es beruht auf der Bindung von Coomassie Brilliantblau G-250 an unhydrolysierte Proteinsubstrate. Da die hydrolysierten Produkte nicht von dem nichtabgebauten Proteinsubstrat abgetrennt werden müssen, ist das Verfahren schnell. Das Verfahren wird zur Bestimmung von Pepsin, Trypsin und Papin eingesetzt. Die erhaltenen Ergebnisse sind gut mit solchen nach dem Verfahren nach M.L. Anson (*J. Gen. Physiol.* **22**, 79 (1938)) erhaltenen vergleichbar. Das Verfahren kann sowohl für rohe als auch für gereinigte Enzympräparate verwendet werden. — *Anal. Biochem.* **105**, 202 - 206 (1980). Biochem. Div., Dept. Chem., Aligarh Muslim Univ., Aligarh (IND) R.H. Sterzel

Removal of protease from streptomyces hyaluronidase by affinity chromatography. C.B. Caputo, J. Schrode, J.H. Kimura and V.C. Hascall.

Trenn. von Protease und Hyaluronidase; Chromatographie, Affinität; Ovomucoïd-CNBr-Sepharose 4B. — Zur Abtrennung von Protease aus Streptomyces-Hyaluronidase wird die Probenlösung an einer Ovomucoïd-Affinitätskolonne (Immobilisierung von Ovomucoïd an CNBr-aktivierten Sepharose 4B) chromatographiert, wobei die Protease gebunden wird und 91% der Hyaluronidase mit maximal 0,7% der Protease die Kolonne passieren. Die Protease kann von der Kolonne mit 0,05 M CaCl₂ eluiert werden, wonach die Kolonne erneut verwendet werden kann. Die gereinigte Hyaluronidase spaltet Hyaluronsäure aus Proteoglykanen ab, ohne deren Molekülgröße merklich zu verändern. Die Fähigkeit, derartiger Monomere, Hyaluronsäure zu binden, ist leicht verringert. — *Anal. Biochem.* **105**, 468 - 475 (1980). Lab. Biochem., Nat. Inst. Dent. Res., Nat. Inst. Health, Bethesda, MD (USA) J.B.

Determination of Serratia protease by radioimmunoassay. K. Miyata, M. Tsuda and K. Tomoda.

Best. von Protease; Radioimmunoassay. — A specific, highly sensitive radioimmunoassay has been developed for the determination of Serratia protease. The radioimmunoassay (RIA) was based upon competition of the protease with ¹²⁵I-labeled protease for antiprotease, followed by a second antibody to separate bound enzyme from free enzyme. The RIA provided a range of 1 to 10 ng for determining the enzymes under conditions in which the enzymatic activity could not be measured. The assay was completely inhibited in the presence of human plasma. The inhibition resulted from a complex formation of the enzyme with plasma α_2 macroglobulin. By treatment of the complex with acetone, however, the RIA could be achieved. — *Anal. Biochem.* **101**, 332 - 338 (1980). Centr. Res. Div., Takeda Chem. Ind., Osaka (J)

A modified Lowry procedure suitable for assay of proteinase activity especially in crude enzyme preparations containing purine bases. M. Higuchi and F. Yoshida.

Best. von Proteinase in Enzympräparaten; Lowry-Verfahren; neben Purinbasen. — Verff. modifizieren ihr in *Anal. Biochem.* **77**, 542 (1977) modifiziertes Lowry-Verfahren, bei dem Chloramin-T zur Eliminierung von Störungen durch SH-Verbindungen verwendet wird. Diese Modifikation läßt die Farbentwicklung für Phenole oder Purinbasen teilweise stark abnehmen. Zur Bestimmung von Proteinase in Proben, die Purinbasen und/oder Sulfhydryl-Verbindungen enthalten, wird daher ein modifiziertes Verfahren vorgeschlagen. Gleiche Teile folgender Inkubationsmischung werden zur Bestimmung der Enzymaktivitäten verwendet: 0,15% Hämoglobin/0,1 M Acetatpuffer/HCl-Puffer (pH 1,7) + Pepsin; 0,5% Casein, M/30 Phosphatpuffer (pH 7,4) und Trypsin oder Chymotrypsin; sowie 0,5% Casein, M/30 Phosphatpuffer (pH 7,4) und die Sulfhydryl- bzw. Bromelain-Verbindung. Das Verfahren wird durch Verbindungen wie Tris oder Sucrose gestört. — *Anal. Biochem.* **105**, 90 - 96 (1980). Lab. Biochem., Fac. Environm. Health, Azabu Univ., Kanagawa (J)

R.H. Sterzel

Automated colorimetric determination of acid proteinase activity in fermentation samples using a trinitrobenzenesulphonic acid reagent. K.A. Holm.

Best. von Proteinasen, sauren in Fermentierungsproben; Autoanalytator; Trinitrobenzolsulfonsäure-Farbstoff. — Auf der Grundlage der Methode 22-62 der American Assoc. of Cereal Chemists (St. Paul,

MN, 1968) wird eine automatische Methode zur Bestimmung der Aktivität von sauren Proteinase in Fermentierungsproben entwickelt. Das Enzym wird bei 40°C und pH 4,7 mit einem Hämoglobin-Substrat inkubiert. Nach Dialyse werden die gebildeten Aminosäuren und Peptide mit Trinitrobenzolsulfonsäure bei pH 9,3 (Borat-Sulfat-Puffer) umgesetzt. Die Messung erfolgt bei 420 nm. Ein Vorteil der im AutoAnalyzer durchgeführten Methode liegt vor allem darin, daß die Farbreaktion unabhängig von den Inkubationsbedingungen ist. — *Analyst* **105**, 18 - 24 (1980). NOVO Res. Inst., Bagsvaerd (DK) B.Seifert

Syntheses, properties and use of fluorescent N-(5'-phospho-4'-pyridoxyl)amines in assay of pyridoxamine (pyridoxine) 5'-phosphate oxidase. M.E. DePecol and D.B. McCormick.

Nachw. von Pyridoxinphosphatoxidase; Fluorimetrie; mit N-(5'-Phospho-4'-pyridoxyl)aminen. — Ein empfindliches und einfaches fluorimetrisches Verfahren zum Nachweis von Pyridoxin-5'-phosphat-oxidase wird entwickelt. Dazu wird das fluoreszierende N-(5'-Phospho-4'-pyridoxyl)amin als Substrat verwendet, welches durch Inkubation mit Oxidase freie fluoreszierende Amine freisetzt. Die Substrate werden durch Kondensation von Pyridoxal-5'-phosphat mit fluoreszierenden Aminen und anschließender Hydrierung der Schiff-schen Basen dargestellt. Da N-1-Naphthylethylendiamin 15 mal weniger fluoresziert als das entstehende Amin, ist die direkte Messung der Fluoreszenz oder auch die selektive Extraktion des stärker fluoreszierenden Produktes zur Bestimmung geeignet. Die erhöhte Empfindlichkeit erlaubt die Bestimmung kleinerer Oxidase-mengen als das mit herkömmlichen kolorimetrischen Verfahren möglich ist. — *Anal. Biochem.* **101**, 435 - 441 (1980). Div. Nutrit. Sci., Sect. Biochem., Mol. Cell Biol., Cornell Univ., Ithaca, NY (USA) R.H. Stenzel

Identification of ribonuclease P activity from chick embryos. E.J. Bowman and S. Altman.

Nachw. von Ribonuclease P in Biolog. Material; Hühnerembryonen. — Die aus Hühnerembryonen isolierte Ribonuclease P vermag Vorläufer der t-RNS aus *E. coli* 129 zu spalten, wenn Mg(II), K(I), Na(I) oder NH₄⁺ vorhanden sind; Proteasen bewirken eine Inaktivierung. Es wird angenommen, daß Ribonuclease P ubiquitär in eukaryontischen Organismen vorkommt. — *Biochim. Biophys. Acta* **613**, 439 - 447 (1980). Dept. Biology, Yale Univ., New Haven, CT (USA) F. Kreuzig

Coupled, continuous and discontinuous fluorometric assays for trehalase activity. K.A. Killick.

Best. von Trehalase; Fluorimetrie. — Für die Bestimmung von Trehalase (in zellfreien Extrakten von *Dictyostelium discoideum*) wird eine kontinuierliche wie auch diskontinuierliche fluorometrische Methode beschrieben. Trehalose wird durch Trehalase in Glucose umgewandelt, diese durch Glucoseoxidase in Gluconsäure und H₂O₂ überführt. Das H₂O₂ wird durch Peroxidase in Gegenwart von Eugenol oder p-Hydroxyphenylelessigsäure zu einer fluoreszierenden Verbindung umgesetzt, deren Fluoreszenz bei 415 bzw. 430 nm (Anregung bei 341 nm) gemessen wird. Die Produktbildung ist der Zeit linear und die Reaktionsgeschwindigkeit der Enzym-Menge. Diskontinuierlich können noch 0,02 nMol Glucose bestimmt werden, eine 500fach höhere Empfindlichkeit gegenüber spektrophotometrischen Methoden, kontinuierlich noch 5 - 25 µEinheiten des Enzyms. Die Methode eignet sich besonders zur quantitativen Bestimmung des Enzyms in Eluaten, von Elektrophoresen oder isoelektrischer Fokussierung sowie zum qualitativen Nachweis *in situ*. — *Anal. Biochem.* **105**, 291 - 298 (1980). Boston Biomed. Res. Inst., Dept. Dev. Biol., Boston, MA (USA) J.B.

Assay of uridine diphosphate glucuronosyltransferase by high-pressure liquid chromatography. M. Matsui and F. Nagai.

Best. von Uridindiphosphat-Glucuronosyltransferase; Chromatographie, HPLC. — Ein neues und einfaches Verfahren zur Bestimmung der Wirkung von Uridindiphosphatglucuronosyltransferase (UDPGA) gegenüber 4-Nitrophenol, Phenolphthalein und Testosteron wird beschrieben. Das Enzym wird aus Rattenlebermikrosomen gewonnen. Die Inkubationsmischung enthält außer der Mikrosomenfraktion 0,1 M Tris-HCl (pH 7,2), 40 µM EDTA, 10 mM MgCl₂, 2 mM UDPGA und 692 µM ¹⁴C-Testosteron. Dann wird einmal 4-Nitrophenol allein und einmal im Gemisch zugesetzt. Die Reaktionsprodukte werden auf einer Hitachigel-Säule mit 0,01 N HCl in 65% Methanol als mobiler Phase getrennt und bei 300 nm nachgewiesen. — *Anal. Biochem.* **105**, 141 - 146 (1980). Kyoritsu Coll. Pharm., Tokyo (J) R.H. Stenzel

Immunological quantitation and immunoabsorption of urokinase-like plasminogen activators secreted by human cells. D. Vetterlein, T.E. Bell, P.L. Young and R. Roblin.

Best. von Urokinase, Plasminogen-Aktivator; Radioimmunologie. — A highly purified preparation of human urinary plasminogen activator (urokinase) was used to produce specific rabbit urokinase antiserum. The urokinase used for rabbit immunizations contained both M_r = 55,000 and 60,000 protein components. The previously unreported M_r = 60,000 component is apparently another high molecular weight form of urokinase, since it can activate plasminogen and is indistinguishable in peptide composition from M_r = 55,000 urokinase. The urokinase antiserum and ¹²⁵I-labelled urokinase have been used to develop an urokinase competition radioimmunoassay which quantitatively determines urokinase in the 3 to 20 ng/sample range. The method has been used to quantitate urokinase-like plasminogen activator present in conditioned media from several different human cells. — *J. Biol. Chem.* **255**, 3665 - 3672 (1980). Nat. Ca. Inst., Ca. Res. Ctr, Frederick, MD (USA)

Fluorescence polarization, assay of plasmin, plasminogen and plasminogen activator. K. Kinoshita, H. Maeda and Y. Hinuma.

Best. von Urokinase; Fluoreszenzpolarisationsbestimm. — We describe two assay methods for plasminogen activator (urokinase) employing the fluorescence polarization technique. One method utilizes fluorescein isothiocyanate-labeled plasminogen as the substrate for urokinase (direct method), and the other utilizes the new plasmin generated from plasminogen by urokinase, for which fluorescein isothiocyanate-labeled fibrinogen was employed as the substrate (indirect method). Also in the assay of trypsin and plasminogen, fluorescein isothiocyanate-labeled fibrinogen was used as the substrate. Proteolysis by the enzymes (urokinase, plasmin and trypsin) yielded smaller peptide fragments from the labeled substrates, resulting in a decreased fluorescence polarization value. Urokinase activity determined by the present method correlated well with the data obtained by the known method with a synthetic chromogenic substrate. Enzyme levels as low as 1.5 mIU/ml (direct method) or 0.11 IU/ml (indirect method) of urokinase and 0.5 millicasein unit/ml and 0.012 µg/ml of plasminogen and trypsin, respectively, were quantified within 1 to 2 h. — *Anal. Biochem.* **104**, 15 - 22 (1980). Dept. Microbiol., Kumamoto Univ. School Med., Kumamoto (J)
