



Fig. 1. a) Dense core vesicles bulging into the extracellular space. b) Extracellular dense core vesicles. c) Aggregation of osmiophilic droplets surrounded by the basal lamina of human eccrine sweat glands. d) Osmiophilic grana in the ductus deferens of the rat. *al* axolemma, *dc* dense core vesicle, *mc* muscle cell, *bm* basal lamina, *ax* axon

of a probable new aspect in the release of "synaptic vesicles". We agree with Grillo, that extracellular vesicles may be "a special feature where close neuroeffector junctions are infrequent or absent". Further studies in our laboratories are being carried out taking the feature of the terminal axolemma into particular consideration. The results demonstrated seem to be not merely artifacts due to the fixation. The occurrence of extraaxonal synaptic vesicles should be subjected to further intensive investigations.

Received January 19, 1972

[1] Grillo, M.: *J. Cell. Biol.* **47**, 547 (1970). — [2] Bretschneider, H.: *Z. mikr.-anat. Forsch.* **69**, 630 (1963). — [3] Wienker, G.: *ibid.* **77**, 19 (1965). — [4] Grillo, M., Palay, S. L., in: Breese, S. S. (Ed.): *Electron Microscopy*, Vol. 2. Philadelphia: Academic Press 1962. — [5] Dermietzel, R.: *Z. mikr.-anat. Forsch.* (in preparation). — [6] Venjakob, K.: Dissertation, Essen 1970.

Mikroelektrophoretische Trennung und Bestimmung von Dehydrogenasen einzelner Zellen

W. Dames und V. Neuhoff

Max-Planck-Institut für experimentelle Medizin, Arbeitsgruppe Neurochemie, Göttingen

Th. Cremer

Institut für Humangenetik und Anthropologie, Freiburg

Bei Verwendung von Enzymen als Marker für genetische Analysen ist die Verwendung von Mikromethoden von Vorteil, da es oft ein Problem ist, ausreichende Mengen von einheit-

lichem Ausgangsmaterial für quantitative Analysen zu gewinnen. Mit der Mikro-Disk-Elektrophorese an 20-proz. Polyacrylamid-Gelen in 2- oder 5- μ l-Kapillaren [1] können aus verdünnten Gewebsextrakten sowie aus einzelnen Eizellen von Maus oder Kaninchen Dehydrogenasen, ihre Isoenzyme und Varianten fraktioniert und ihre enzymatische Aktivität durch Inkubation der Gele im Tetrazolium-System [2] quantitativ bestimmt werden. Untersucht wurden besonders G6P-DH und LDH. Der Nachweis weiterer Enzyme (SDH, ADH, MDH, 6PG-DH, PGI) ist gleichfalls möglich.

Nachweisgrenze. Die Aktivität von 1 μ l (Verdünnung 1:10⁶) reiner Hefe-G6P-DH (Boehringer, ca. 10⁻¹⁷ Mol G6P-DH) kann nach Elektrophorese in 5- μ l-Kapillaren (\varnothing 0,45 mm) sicher als einzelne enzymatisch aktive Bande nachgewiesen werden. Für die Fraktionierung und den Nachweis von LDH bzw. G6P-DH aus Gewebe oder Zellkulturen genügen 0,2 bis wenige μ g Feuchtgewicht. Dementsprechend ist eine einzelne Eizelle von Maus oder Kaninchen ausreichend für den sicheren Nachweis von G6P-DH oder LDH. Die LDH-Aktivität in unbebauten Eizellen der Maus ist so hoch, daß der Extrakt einer Eizelle für mehrere Mikroelektrophoresen und LDH-Bestimmungen ausreicht.

Trennung von Isoenzymen bzw. Enzymvarianten. Die Fraktionierung der LDH-Isoenzyme aus Organextrakten ist ebenso möglich wie die Trennung von G6P-DH-Varianten aus gemischten Organextrakten von Mensch und Ratte bzw. von Zellkulturen von Mensch und Maus. Durch die Mikro-Disk-Elektrophorese sind die Isoenzyme bzw. Enzymvarianten so weit voneinander getrennt, daß mit den einzelnen Enzym-Banden kinetische Untersuchungen möglich sind.

Kinetik im Mikro-Gel. Für kinetische Untersuchungen wird in einer Spezialkammer die Bildung des blauen Farbstoffes am enzymatisch aktiven Gel-Ort in definierten Zeitabständen mit einem Mikro-Densitometer registriert. Werden die planimetrisch bestimmten Peak-Flächen gegen die Zeit aufgetragen, resultiert eine Gerade mit streng linearer Korrelation, die bei einer Auftragsmenge von ca. 0,6 \times 10⁻¹² g reiner Hefe-G6P-DH bis zu 80 min verfolgt werden konnte. Die Steigung der Regressionsgeraden ist ein Maß für die Extinktionszunahme pro Zeiteinheit und kann somit als Maß für die enzymatische Aktivität dienen. Werden die Steigungen aus Einzelversuchen (Korrelationskoeffizienten $r = 0,999$ bis 0,981) gegen die eingesetzten Enzym-Mengen aufgetragen, können für jedes Enzym Eichkurven aufgestellt werden. Enzymproteine gehen während der Inkubationszeit nicht durch Diffusion in das Inkubationsmedium verloren. Das Gel verhält sich demnach wie eine Mikroküvette. Die mittlere Breite von 20–100 μ m einer Protein-Bande in einer 5- μ l-Kapillare entspricht einem „Küvettenvolumen“ von 0,003–0,015 μ l. Dadurch wird es möglich, auch Bindungskonstanten nach Fraktionierung im Mikro-Gel zu bestimmen, wie am Beispiel von Glucose-6-phosphat und Hefe-G6P-DH überprüft wurde. Die Stimulierung der G6P-DH-Aktivität durch Mg²⁺ ließ sich ebenfalls nachweisen. Diese Mikromethode ist für die genetische Analyse von interspezifischen somatischen Hybridzellklonen sowie die Analyse von Gen-Aktivierungsprozessen individueller Keime in der frühen Säuger-Embryogenese geeignet.

Die Methode wurde während des 2nd EMBO-Course on Micro-methods in Molecular Biology [3] im Oktober 1971 demonstriert. Eine ausführliche Mitteilung ist in Vorbereitung.

Eingegangen am 17. Februar 1972

[1] Neuhoff, V.: *Arzneim.-Forsch.* **18**, 35 (1968). — [2] Brewer, G. J., Sing, Ch. F.: *An Introduction to Isoenzyme Techniques*. New York-London: Academic Press 1970. — [3] Neuhoff, V.: *Manual, 2nd EMBO-Course on Micromethods in Molecular Biology, 1971*, Max-Planck-Gesellschaft, Dokumentationsstelle.