Substratfilmtest für den Proteasennachweis

Von H.-W. Denker
(Arbeitsgruppe Professor Gottschewski, Max-Planck-Institut für Immunbiologie, Freiburg i. Br.)

Mit einer Abbildung im Text

Für den Proteasennachweis sind einige Substratfilmtests bereits angegeben worden (Adams und Tuqan 1961, Roitt u. a. 1965, Kwaan 1964, Cunningham 1967). Die Methode, die hier beschrieben werden soll, zeichnet sich durch Einfachheit und Vielseitigkeit aus. Sie hat sich bewährt bei der Demonstration der proteolytischen Enzyme, die bei der Implantation des Säugetierkeims im Uterus eine Rolle spielen. In anderen Geweben, z. B. der Glandula submandibularis, ist sie den bekannten Tests zumindest ebenbürtig.

Durch Substratfilmtests werden im typischen Fall depolymerisierende, diffusible Enzyme nachgewiesen. Das Substrat wird in Form eines Ausstrichs angeboten; er ist entweder unter den Inkubationsbedingungen von Natur aus unlöslich oder in eine unlösliche Form überführt worden. Die Schnitte montiert man heute meist direkt auf den Film (vgl. Daoust 1965). Die Orte der Enzymaktivität werden nachgewiesen durch Auswaschen der diffusiblen Spaltprodukte und Färbung der stehengebliebenen Filmteile. Spezifisch ist der Test nur, wenn der Film nur von einem einzigen im Gewebe vorhandenen Enzym angegriffen werden kann.

In dem Test, der hier beschrieben wird, kommen Gelatineausstriche zur Anwendung. Nachgewiesen werden daher verschiedene Proteasen. Die Ausstriche müssen fixiert werden, um bei 37 °C inkubieren zu können. Bei Fixierung in Formol können die Filme gegenüber einigen Proteasen recht resistent werden. Verschiedene Fabrikate von Gelatine verhalten sich z. T. unterschiedlich (vgl. Sierakowska und Shugar 1961). Alkoholzusätze in verschiedenen Konzentrationen beeinflussen den Quellungszustand der Gelatine (vgl. Nemetschek 1968, Schnell 1968). Dadurch und durch verschiedene Dicke des Films kann man die Diffusion des Enzyms im Film und die Größe der Abbauzone regulieren. Auf diese Weise ist leicht eine Anpassung an die Erfordernisse verschiedener Enzyme in verschiedenen Geweben möglich.

Herstellung der Substratfilme

Von 5% Gelatinelösung (Gelatine Merck) Ausstriche auf Objektträger herstellen (0,2 oder 0,4 m*l* auf 5×2,5 cm), auf kühler Fläche waagerecht erstarren und vollständig trocknen lassen.

Fixierung:

Für verschiedene Enzyme und Gewebe sind verschiedene Fixierungen optimal. Getestet werden Fixierungsgemische aus: 10 m*l* Formaldehydlösung säurefrei (Merck) + 90 m*l* Äthanol 100%, 80%, 50%, 20% oder Aqua bidest.

Ausführung der Fixierung: 6 Stunden bei 4 °C oder Zimmertemperatur.

Anschließend 20 Minuten in fließendem Leitungswasser von weniger als 20 °C waschen, Aqua dest., Lufttrocknung.

Die Ausstriche sind, bei Zimmertemperatur trocken gelagert, mehrere Wochen lang haltbar. Vor Gebrauch in 1/15 m Phosphatpufferlösung des gewünschten *p*H 15 Minuten quellen lassen, senkrecht an der Luft trocknen lassen.

Ausführung des Tests

Kryostat-Nativschnitte auf den trockenen Film montieren. Inkubation in mit Vaseline gedichteten feuchten Kammern bei 37 °C 10 Minuten bis 6 Stunden (auch eine Inkubation in flüssigen Medien ist möglich, vgl. Cunningham 1967).

Schnell in Fixierungsgemisch überführen (Formol 30 m*l*, Aqua dest. 70 m*l*, < 20 °C) für > 10 Minuten.

Waschen in fließendem Leitungswasser 10 Minuten, Aqua dest. (nicht trocknen lassen), Färbung in alkalischer Toluidinblaulösung (0,5 % Toluidinblau in Boratpuffer *p*H 10,0) 10 bis 40 Minuten. Nach 40 Minuten ist der Farbstoff unter alle Partien des Schnittes gedrungen, mit Ausnahme nur extrem fettreicher Orte. Spülen und nötigenfalls differenzieren in Leitungswasser, Aqua dest., Lufttrocknung.

Entwässern in der Alkoholreihe (ab 80 %), Xylol, Einschluß.

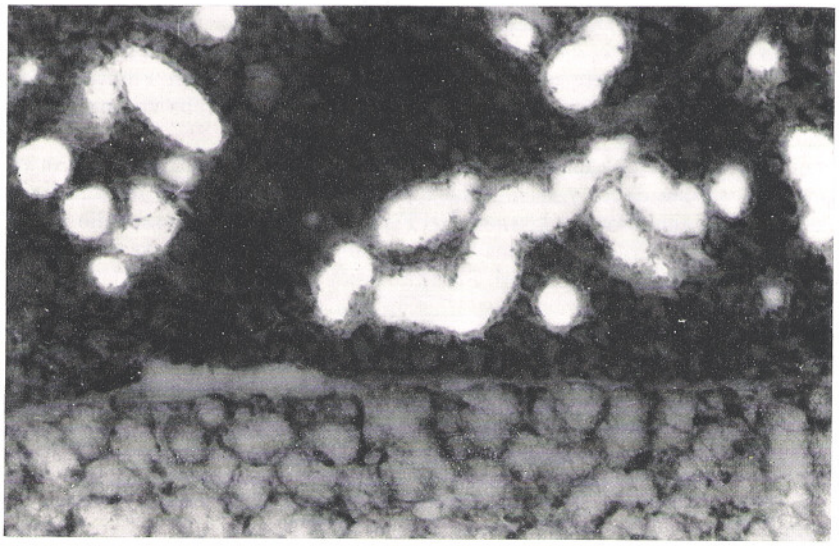

Abb. 1. Substratfilmtest für den Proteasennachweis, Glandulae submandibularis (oben) und sublingualis major (unten), Ratte. 100×. Fixierung des Substratfims im Formolgemisch mit 50 % Äthanol bei Zimmertemperatur. pH 7,5. Inkubationsdauer 30 Min. Scharf begrenzte Abbauzonen in der Glandula submandibularis.

Ergebnis

Ungefärbte oder schwach gefärbte Partien des Substratfilms geben die Orte der Enzymaktivität an.

Literatur

ADAMS, C. W. M., N. A. TUQAN: The histochemical demonstration of protease by a gelatin-silver film substrate. J. Histochem. Cytochem. **9**, 469–472 (1961).

CUNNINGHAM, L.: Histochemical observations of the enzymatic hydrolysis of gelatin films. J. Histochem. Cytochem. **15**, 292–298 (1967).

DAOUST, R.: Histochemical localization of enzyme activities by substrate film methods: ribonucleases, deoxyribonucleases, proteases, amylase and hyaluronidase. Internat. Rev. Cytol. (G. H. BOURNE, J. F. DANIELLI, Eds.) **18**, 191 (1965).

KWAAN, H. C.: A histochemical study of fibrinolytic activity and content of protease in mast cells. Amer. J. Clin. Path. **41**, 604–608 (1964).

NEMETSCHEK, TH.: Zur Kenntnis der Quellung von Kollagen in Alkanolen. Z. Naturforsch. **23b**, 507–511 (1968).

ROITT, I. M., K. J. BALLARD, S. J. HOLT, D. DONIACH, G. TORRIGIANI, C. SHAPLAND: Histochemical localization of *p*H 3.5 protease in the human thyroid gland. Current Topics in Thyroid Research (C. CASSANO, M. ANDREOLI, Eds.) New York: Academic Press, p. 29–35 (1965).

SCHNELL, J.: Evidence for the existence of hydrophobic interactions as a stabilizing factor in collagen structure. Arch. Biochem. **127**, 496–502 (1968).

SIERAKOWSKA, H., D. SHUGAR: Gross histochemical localization of tissue nuclease enzymes. Acta Biochim. Polon. **8**, 427–436 (1961).

Anschrift des Verfassers: Dr. H.-W. DENKER, Arbeitsgruppe Professor G. H. M. Gottschewski, Max-Planck-Institut für Immunbiologie, Freiburg i. Br., Stefan-Meier-Straße 8.

Einzeln nicht im Buchhandel

Überreicht vom Verfasser

Acta histochemica

Herausgegeben von HERMANN VOSS, Greifswald, GERHARD E. VOIGT, Lund, und JOACHIM-HERMANN SCHARF, Halle

---

Sonderdruck aus

Supplementband X

Histochemie der Ultrastruktur

Verhandlungen
der Gesellschaft für Histochemie
auf dem XIII. Symposion in Graz vom 17. bis 21. September 1969

Herausgegeben von

HORST ZIMMERMANN, Frankfurt a. M.-Höchst

VEB GUSTAV FISCHER VERLAG JENA

Alle Rechte vorbehalten · Printed in the German Democratic Republic
Lizenznummer 261 700/142/71