

## Anleitung für Isoenzymuntersuchungen bei Buche (*Fagus sylvatica*)

(erstellt in Zusammenarbeit von FVA Freiburg und ASP Teisendorf)

**Monika Konnert\*, Erwin Hussendörfer\*\*, Aikaterini Dounavi\*\***

Technische Bearbeitung: Th. Wimmer, S. Nowak, E. Häusl, K. Mader, (ASP Teisendorf)

\* ASP Teisendorf, \*\* FVA Freiburg

### Untersuchte Enzymsysteme (*Enzyme systems investigated*)

**Tab. 1: Übersicht über die bei Buche untersuchten Enzymsysteme und deren kontrollierende**

| <i>Enzym und Nomenklatur</i>                            | <i>Genort</i>                       | <i>Struktur</i> | <i>Häufige Allele</i>  | <i>Trenn-System</i> | <i>Labor</i> |
|---|-------------------------------------|-----------------|--|---------------------|--------------|
| Aconitase (ACO)<br>E.C.4.2.1.3                          | ACO-A*<br>ACO-B*                    | Monomer         | A <sub>2</sub><br>B <sub>3</sub>                                   | T.-C.               | ASP<br>FVA   |
| Aspartataminotransferase (AAT,GOT)<br>E.C.2.6.1.1       | AAT-A*<br>AAT-B*                    | Dimer           | A <sub>2</sub><br>B <sub>3</sub>                                   | Poulik              | ASP<br>FVA   |
| Glutamatdehydrogenase (GDH)<br>E.C.1.4.1.2              | GDH-A*                              | Hexamer         | A <sub>3</sub>   | Poulik              | ASP          |
| Isocitratdehydrogenase (IDH)<br>E.C.1.1.1.42            | IDH-A*                              | Dimer           | A <sub>3</sub>   | T.-C.               | ASP<br>FVA   |
| Leucinaminopeptidase (LAP)<br>E.C.3.4.11.1              | LAP-A*<br>LAP-B*                    | Monomer         | A <sub>2</sub> ,A <sub>3</sub> ,A <sub>4</sub><br>B <sub>2</sub>   | Ashton              | ASP<br>FVA   |
| Malatdehydrogenase (MDH)<br>E.C.1.1.1.37                | MDH-A*<br>MDH-B*<br>MDH-C*          | Dimer           | A <sub>3</sub><br>B <sub>3</sub><br>C <sub>2</sub>                 | T.-C.               | ASP<br>FVA   |
| Menadionreduktase (MNR, DIA)<br>E.C.1.6.99.2            | MNR-A*                              | Monomer         | A <sub>3</sub>   | Poulik              | ASP<br>FVA   |
| NADH-Dehydrogenase (NADH)<br>E.C.1.6.99.3               | NADH-B*                             | Monomer         | B <sub>3</sub>   | T.-C.               | FVA          |
| 6-Phosphogluconatdehydrogenase (6-PGDH)<br>E.C.1.1.1.44 | 6-PDGH-A*<br>6-PGDH-B*<br>6-PGDH-C* | Dimer           | A <sub>2</sub><br>B <sub>2</sub><br>C <sub>1</sub> ,C <sub>4</sub> | T.-C.               | ASP<br>FVA   |
| Phosphoglucose-Isomerase (PGI)<br>E.C.5.3.1.9           | PGI-B*                              | Dimer           | B <sub>2</sub>   | Ashton              | ASP<br>FVA   |
| Phosphoglucomutase (PGM)<br>E.C.2.7.5.1                 | PGM-A*                              | Monomer         | A <sub>2</sub> ,A <sub>3</sub>                                     | Poulik o.<br>T.-C.  | ASP<br>FVA   |
| Shikimatdehydrogenase (SKDH)<br>E.C.1.1.1.25            | SKDH-A*                             | Monomer         | A <sub>3</sub>   | T.-C.               | ASP<br>FVA   |

Die mit \* gekennzeichneten Genorte sollten im Rahmen des Verfahrens Herkunftssicherheit ausgewertet werden.

Genorte.

## Enzymextraktion (*Enzyme extraction*)

Proben von Knospengewebe (grünes meristematisches Gewebe) und Proben von Samengewebe werden in einem Tris-HCl-Puffer pH 7,2 homogenisiert.

### Zusammensetzung des Homogenatpuffers (*Extraction buffers*) pH 7,2

100 ml Homogenatpuffer Tris/HCl 0,1 M pH 7,2 enthalten:

|                    |           |       |
|--------------------|-----------|-------|
| PVP                | (3 %)     | 3 g   |
| β- Mercaptoethanol | (0,07 mM) | 30 µl |

**Anmerkung:** Weitere Zusätze im Homogenatpuffer bringen keine wesentliche Verbesserung der Trennungen.

## Trennsysteme, Gelzusammensetzung und Laufbedingungen (*Starch gel separation systems and separation conditions*)

### Biomol-Stärke

| Trennsystem     | Gelpuffer               | Gelzusammensetzung          | Stromstärke            | Laufzeit |
|-----------------|-------------------------|-----------------------------|------------------------|----------|
| * Ashton        | pH 8,1 300 ml (10 % EP) | 33,0 g Stärke, 6,0 g Sacch. | 100 mA<br>(U = const.) | 5 h      |
| Poulik          | pH 8,7 300 ml           | 33,0 g Stärke               | 90 mA<br>(I = const.)  | 4,5 h    |
| ..              |                         |                             |                        |          |
| Tris-Citro (Bu) | pH 7,5 270 ml           | 31,0 g Stärke, 4,0 g Sacch. | 175 mA<br>(I = const.) | 5,5 h    |

\* Glasplatte 27 \* 11,5 cm

### Gerbu-Stärke

| Trennsystem     | Gelpuffer   | Gelzusammensetzung          | Stromstärke            | Laufzeit |
|-----------------|---|-----------------------------|------------------------|----------|
| * Ashton        | pH 8,1 300 ml (10 % EP)<br>(1:0,5 dest. H <sub>2</sub> O) | 27,0 g Stärke, 5,0 g Sacch. | 100 mA<br>(U = const.) | 4,5 h    |
| ..              |   |                             |                        |          |
| Poulik          | pH 8,7 300 ml (GP mit 3 % EP)                             | 27,0 g Stärke, 2,0 g Sacch. | 110 mA<br>(I = const.) | 4 h      |
| Tris-Citro (Bu) | pH 7,5 330 ml<br>(1:3 dest. H <sub>2</sub> O)             | 29,0 g Stärke, 3,0 g Sacch. | 170 mA<br>(I = const.) | 5,5 h    |

\* Glasplatte 27 \* 11,5 cm

### a) Rezepturen ASP Teisendorf

**b) Rezepturen FVA Freiburg (Biomol-Stärke)**

| <b>Trennsystem</b>   | <b>Stärke<br/>(in g)</b> | <b>Zucker<br/>(in g)</b> | <b>Harnstoff<br/>(in g)</b> | <b>Puffer<br/>(in ml)</b> | <b>Stärke-<br/>konzentration</b> |
|--|--------------------------|--------------------------|-----------------------------|---------------------------|----------------------------------|
| <b>Tris-Citro pH 7,5</b><br>(1 Gel / 3 Schichten)              | 26,4                     |                          | 1,9                         | 220                       | 12%                              |
| <b>Tris-Citro pH 8,5</b><br>(1 Gel / 3 Schichten)              | 26,4                     |                          | 1,9                         | 220                       | 12%                              |
| <b>Tris-Citro-Histidin pH<br/>6,2</b><br>(1 Gel / 3 Schichten) | 26,4                     | 4,4                      |                             | 220                       | 12%                              |
| <b>Ashton pH 8,1</b><br>(1 Gel / 3 Schichten)                  | 25,3                     | 4,4                      |                             | 220                       | 11,5%                            |

**Gelschnitte (*gel slabs*) (ASP Teisendorf)**

|                   | <b>unten</b> | <b>mitte</b> | <b>oben</b>        |          |
|-------------------|--------------|--------------|--------------------|----------|
| <b>Ashton</b>     | o<br>LAP     | -<br>PGI     | o<br>FEST oder ADH |          |
| <b>Poulik</b>     | +<br>GOT     | -<br>PGM     | o<br>MNR           |          |
| <b>Tris-Citro</b> | o<br>IDH     | o<br>6-P     | o<br>MDH           | o<br>SDH |

Gelschnitte: - = dünn o = mittel + = dick

## Zusammensetzung der Trennpuffer (*Gel and electrode buffer composition*)

### a) Rezepturen ASP Teisendorf

| <b>Ashton pH 8,1</b>  |  |           |
|---|--|-----------|
| <b>Elektrodenpuffer pH 8,1*</b>                                     |  |           |
| Borsäure  | 190 mmol/l   | 11,8 g/l  |
| Lithiumhydroxid   | ~26 mmol/l   | ~ 1,3 g/l |
| * 190 mM Borsäure mit Lithiumhydroxid ~ 26mM auf pH 8,1 einstellen. |  |           |
| <b>Gelpuffer pH 8,1**</b>   |  |           |
| Tris  | 50 mmol/l  | 6,1 g/l   |
| Citronensäure H <sub>2</sub> O                                      | 8 mmol/l   | 1,7 g/l   |
| <b>WICHTIG:</b>   | ** Der zu verwendende Endpuffer besteht zu 90% aus obigem Gelpuffer und 10% des Elektrodenpuffers. |           |

| <b>Poulik pH 8,2</b>           |   |           |
|--------------------------------|---|-----------|
| <b>Elektrodenpuffer pH 8,2</b> |   |           |
| Borsäure                       | 300 mmol/l  | 18,5 g/l  |
| Natriumhydroxid                | ~60 mmol/l  | ~ 2,4 g/l |
| <b>Gelpuffer pH 8,7</b>        |   |           |
| Tris                           | 70 mmol/l   | 8,5 g/l   |
| Citronensäure H <sub>2</sub> O | 35 mmol/l   | ~ 7,4 g/l |
| <b>Bemerkungen:</b>            | Gel- bzw. E.-Puffer mit NaOH bzw. Citronensäure auf den jeweiligen pH-Wert einstellen |           |

| <b>Tris-Citro pH 7,5</b>  |            |           |
|---|------------|-----------|
| <b>Elektrodenpuffer pH 7,5</b>  |            |           |
| Tris  | 140 mmol/l | 18,17 g/l |
| Citronensäure H <sub>2</sub> O  | 41 mmol/l  | ~ 8,6 g/l |
| <b>Gelpuffer pH 7,5</b>   |            |           |
| Elektrodenpuffer im Verhältnis 1:6,5 mit H <sub>2</sub> O dest. mischen |            |           |

**b) Rezepturen FVA Freiburg**

| <b>Tris-Citro pH 7,5</b>   |   |
|--|---|
| Elektrodenpuffer   | Gelpuffer pH 7,5  |
| Tris (140 mmol/l)<br>17,0 g/l<br>Citronensäure H <sub>2</sub> O (43 mmol/l)<br>9 g/l   | Tris (40 mmol/l)<br>24,29 g/ 5l<br>Citronensäure H <sub>2</sub> O (12,28 mmol/l)<br>12,86 g/ 5l   |
| <b>Tris-Citro pH 8,5</b>   |   |
| Elektrodenpuffer   | Gelpuffer pH 8,5  |
| Tris (140 mmol/l)<br>17,0 g/l<br>Citronensäure H <sub>2</sub> O (17 mmol/l)<br>3,5 g/l | Tris (40,1 mmol/l)<br>4,86 g/l<br>Citronensäure H <sub>2</sub> O (4,8 mmol/l)<br>1 g/l  |
| <b>Tris-Citro-Histidin pH 6,2</b>  |   |
| Elektrodenpuffer T.C. pH 7,5   | Gelpuffer pH ~ 6,7  |
| Tris (140 mmol/l)<br>17,0 g/l<br>Citronensäure H <sub>2</sub> O (43 mmol/l)<br>9 g/l   | L-Histidin (50 mmol/l)<br>10,5 g/l<br>Titriplex II (1,4 mmol/l)<br>0,4 g/l<br>Tris (510 mmol/l)<br>6,0 g/l  |
| <b>Ashton pH 8,1</b>   |   |
| Elektrodenpuffer   | Gelpuffer pH 8,1  |
| Borsäure (190 mmol/l)<br>11,8 g/l<br>Lithiumhydroxid (50 mmol/l)<br>1,1 g/l            | Tris (50 mmol/l)<br>6,1 g/l<br>Citronensäure (0,8 mmol/l)<br>1,7 g/l<br>Borsäure (19 mmol/l)<br>1,2 g/l<br>Lithiumhydroxid (5 mmol/l)<br>0,11 g/l |

## Visualisierung der Enzyme (*Enzyme vizualisation*)

### Puffer für Färbelösungen (*stain buffer recipes*)

#### *Tris-HCl 0,05 mol/l*

30,27 g TRIS in 4500 ml dest. H<sub>2</sub>O lösen und mit HCl (ca. 10 %) auf gewünschten pH-Wert bringen, danach auf 5000 ml auffüllen.

#### *Tris-HCl 0,2 mol/l*

48,44 g TRIS in 1800 ml dest. H<sub>2</sub>O lösen und mit HCl (ca. 10 %) auf gewünschten pH-Wert bringen, danach auf 2000 ml auffüllen.

#### *Tris-Maleat 0,05 mol/l pH 5,4*

12,2 g TRIS in etwa 1200 ml und 11,13 g Maleinsäureanhydrid in etwa 400 ml dest. H<sub>2</sub>O lösen; unter pH-Kontrolle beide Lösungen vermischen und auf 2000 ml auffüllen.

Die Pufferlösungen sind bei Raumtemperatur mehrere Wochen verwendbar.

### Stammlösungen (*Stock solutions*)

|  |                 |       |
|--|-----------------|-------|
| NADP-Lösg.                             | 8 mg/ml         |       |
| NAD-Lösg.                              | 10 mg/ml        |       |
| MgCl <sub>2</sub> -Lösg. (10 %)        | 50 g auf 500 ml |       |
| MTT-Lösg.                              | 6 mg/ml         |       |
| PMS-Lösg.                              | 6 mg/ml         |       |
| NBT-Lösg.                              | 3 mg/ml         |       |
| 6-Phosphogluconsäure-tri-Na-Salz-Lösg. | 30 mg/ml        | (6-P) |
| DL-Isocitronensäure-tri-Na-Salz-Lösg.  | 40 mg/ml        | (IDH) |
| Fructose-6-phosphat-di-Na-Salz-Lösg.   | 20 mg/ml        | (PGI) |
| Glucose-1-phosphat-di-Na-Salz-Lösg.    | 40 mg/ml        | (PGM) |
| 8 g Apfelsäure/50 ml TRIS pH 8,0       |                 | (MDH) |

## Zusammensetzung der einzelnen Färbelösungen (Stock solutions)

### **Aconitase (ACO/E.C. 4.2.1.3)**

|                                 |        |
|---------------------------------|--------|
| Tris-HCl-Puffer (0,2M) pH 8,0   | 70 ml  |
| Cis-Aconitsäure                 | 100 mg |
| MgCl <sub>2</sub> -Lösg. (10 %) | 2 ml   |
| NADP-Lösg.                      | 2 ml   |
| MTT-Lösg.                       | 2 ml   |
| PMS-Lösg.                       | 300 µl |
| Isocitratdehydrogenase          | 500 µl |

### **Aspartataminotransferase (AAT, GOT / E.C. 2.6.1.1)**

#### **Substratlösung:**

|   |         |
|---|---------|
| Tris-HCl (0,2M) pH 8,0                          | 200 ml  |
| L-Asparaginsäure                                | 1,06 g  |
| alpha-Ketoglutarinsäure                         | 0,140 g |
| -auflösen und auf pH 8,0 mit 2M NaOH einstellen |         |

#### *Färbung pro Schale:*

|                       |       |
|-----------------------|-------|
| Substratlösung        | 70 ml |
| Fast Blue BB Salt     | 70 mg |
| Pyridoxal-5-Phosphate | 10 mg |

**Bemerkungen:** Bei zu schwacher Anfärbung der C-Zone die Einwaage von L-Asparaginsäure, alpha-Ketoglutarinsäure, Fast Blue BB Salt und Pyridoxal-5-Phosphate um das anderthalbfache erhöhen. Dickere Gelschicht für die Anfärbung verwenden (am besten oberste Schicht verwenden).

### **Glutamatdehydrogenase (GDH/E.C. 1.4.1.2)**

|                        |        |
|------------------------|--------|
| Tris-HCl-Puffer pH 8,5 | 70 ml  |
| L-Glutamic acid        | 20 mg  |
| NAD-Lösg.              | 1,5 ml |
| MTT-Lösg.              | 2 ml   |
| PMS-Lösg.              | 300 µl |

**Isocitratdehydrogenase (IDH/E.C. 1.1.1.42)**

|                                       |        |
|---------------------------------------|--------|
| Tris-HCl-Puffer pH 8,5                | 70 ml  |
| DL-Isocitronensäure-tri-Na-Salz-Lösg. | 3 ml   |
| MgCl <sub>2</sub> -Lösg. (10 %)       | 2 ml   |
| NADP-Lösg.                            | 2 ml   |
| MTT-Lösg.                             | 2 ml   |
| PMS-Lösg.                             | 300 µl |

**Leucinaminopeptidase (LAP/E.C.3.4.11.1)**

|                          |       |
|--------------------------|-------|
| Tris-Maleat pH 5,4       | 75 ml |
| Leucin-B-naphtylamid-HCl | 50 mg |
| Fast Black K             | 40 mg |

**Malatdehydrogenase (MDH/E.C. 1.1.1.37)**

|                            |        |
|----------------------------|--------|
| Tris-HCl-Puffer pH 8,5     | 70 ml  |
| L-Apfelsäure-Na-Salz-Lösg. | 3 ml   |
| NAD-Lösg.                  | 1,5 ml |
| MTT-Lösg.                  | 2 ml   |
| PMS-Lösg.                  | 300 µl |

**Menadionreduktase (MNR, DIA/E.C.1.6.99.2)**

|   |       |
|---|-------|
| Tris-HCl-Puffer pH 7,0                      | 70 ml |
| Menadione Na(SO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> | 30 mg |
| NADH  | 30 mg |
| NBT-Lösg.                                   | 10 ml |

**NADH-Dehydrogenase (NADH/1.6.99.3)**

|                        |        |
|------------------------|--------|
| Tris-HCl-Puffer pH 8,0 | 70 ml  |
| NADH                   | 30 mg  |
| MTT-Lösg.              | 1,5 ml |

NADH erst kurz vor dem Anfärben dazu geben.

**6-Phosphogluconatdehydrogenase (6-PGDH / E.C. 1.1.1.44)**

Buche 04/2004



|                                   |        |
|-----------------------------------|--------|
| Tris-HCl-Puffer pH 8,5            | 70 ml  |
| 6-Phosphogluconsäure-tri-Na-Salz  | 2 ml   |
| MgCl <sub>2</sub> -Lösung. (10 %) | 2 ml   |
| NADP-Lösung.                      | 2 ml   |
| MTT-Lösung.                       | 2 ml   |
| PMS-Lösung.                       | 300 µl |

### **Phosphoglucose-Isomerase (PGI / E.C. 5.3.1.9)**

|                                   |        |
|-----------------------------------|--------|
| Tris-HCl-Puffer pH 8,5            | 70 ml  |
| Fructose-6-phosphat-Lösung.       | 2 ml   |
| MgCl <sub>2</sub> -Lösung. (10 %) | 2 ml   |
| NADP-Lösung.                      | 1 ml   |
| MTT-Lösung.                       | 2 ml   |
| PMS-Lösung.                       | 300 µl |
| Glucose-6-phosphatdehydrogenase   | 15 µl* |

\* erst kurz vor Beginn der Färbung hinzugeben

### **Phosphoglucomutase (PGM / E.C. 2.7.5.1)**

|                                   |        |
|-----------------------------------|--------|
| Tris-HCl-Puffer pH 8,5            | 70 ml  |
| D-Glucose-1-phosphat-di-Na-Salz   | 90 mg  |
| MgCl <sub>2</sub> -Lösung. (10 %) | 2 ml   |
| NADP-Lösung.                      | 1 ml   |
| MTT-Lösung.                       | 2 ml   |
| PMS-Lösung.                       | 300 µl |
| Glucose-6-phosphatdehydrogenase   | 15 µl* |

\* erst kurz vor Beginn der Färbung hinzugeben

### Shikimatdehydrogenase (SKDH/E.C. 1.1.1.25)

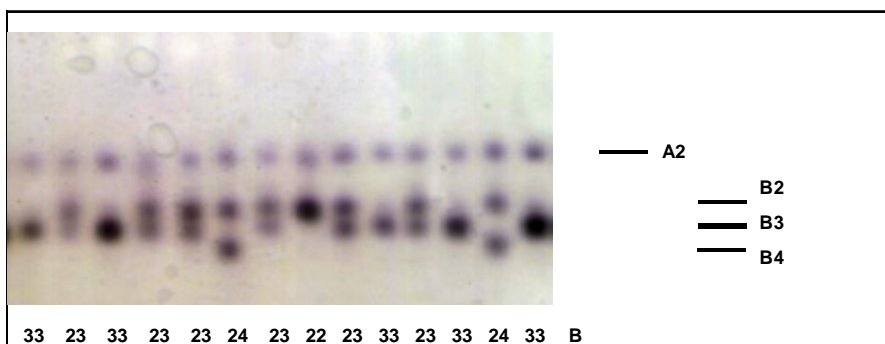
|                                 |        |
|---------------------------------|--------|
| Tris-HCl-Puffer pH 8,5          | 70 ml  |
| Shikimisäure                    | 30 mg  |
| MgCl <sub>2</sub> -Lösg. (10 %) | 2 ml   |
| NADP-Lösg.                      | 1 ml   |
| MTT-Lösg.                       | 2 ml   |
| PMS-Lösg.                       | 300 µl |

### Interpretation der Zymogramme (*Genetic interpretation of banding patterns*)

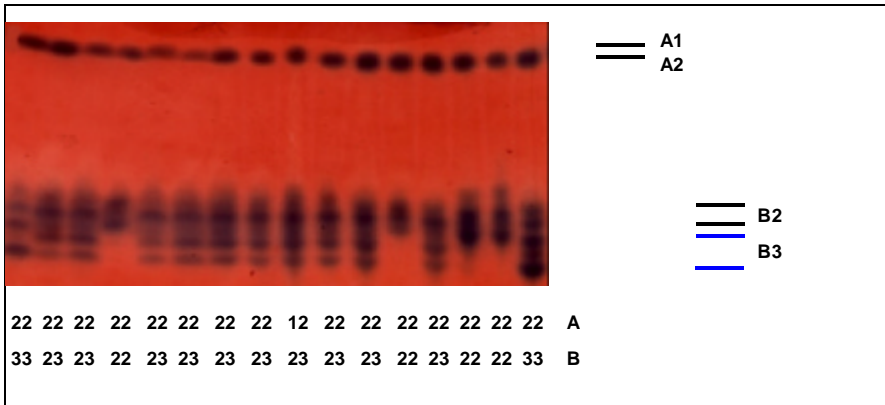
In den folgenden Abbildungen sind für jedes System Abbildungen der Zymogramme angegeben, die als Orientierung bei der Auswertung dienen können. Auf eine detaillierte Beschreibung der einzelnen Systeme wurde verzichtet, da diese bereits in einem Laborhandbuch (Müller-Starck et al. 2001 ) veröffentlicht wurden. Für die Systeme GDH und NADH sind keine Photos angegeben, da die Anfärbungen sehr schwach waren. Deshalb wurden diese Systeme bei den Prüfungen zur Herkunftssicherung nicht weiter eingesetzt.

MÜLLER-STARCK, G.; WUEHLISCH, v. G.; KONNERT, M. (2001): Labormanual zur Durchführung von Isoenzymanalysen bei Buche (*Fagus sylvatica* L.). URL: (<http://www.forst.tu-muenchen.de/EXT/LST/GENET/index.htm>).

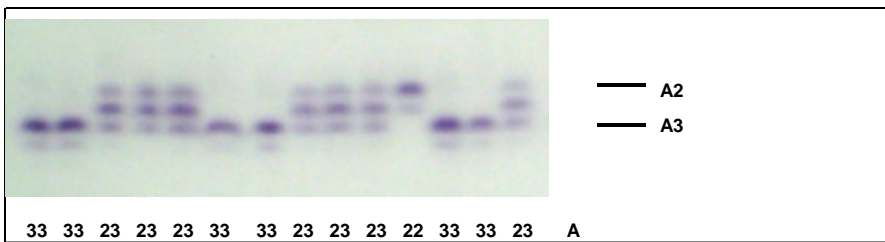
### Aconitase (ACO) E.C.4.2.1.3



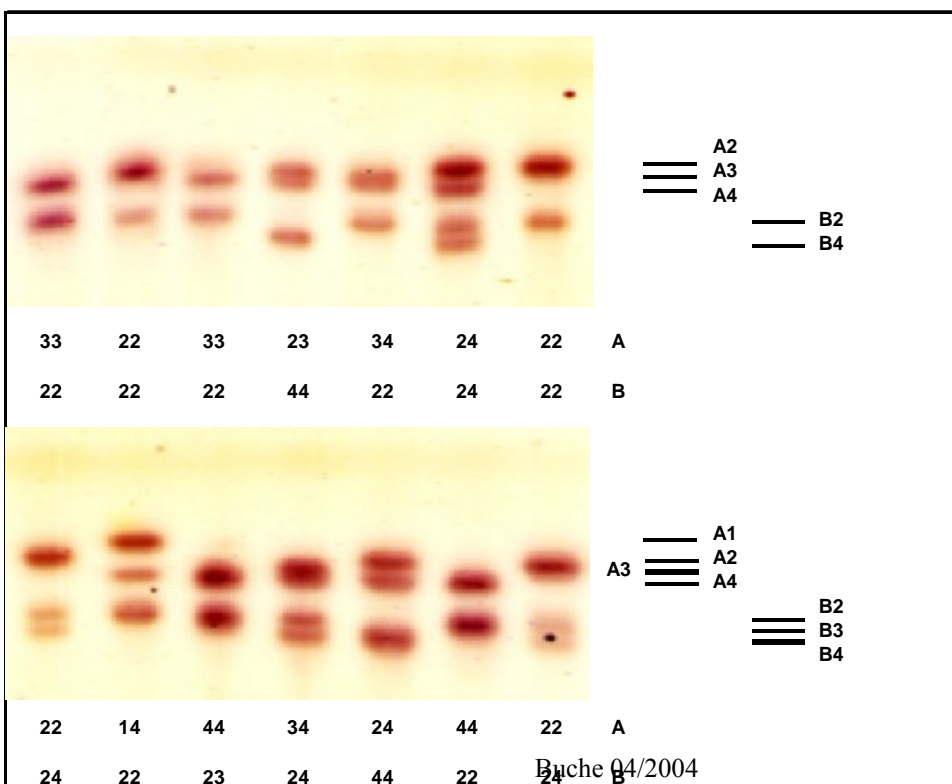
### Aspartataminotransferase (AAT, GOT) E.C.2.6.1.1



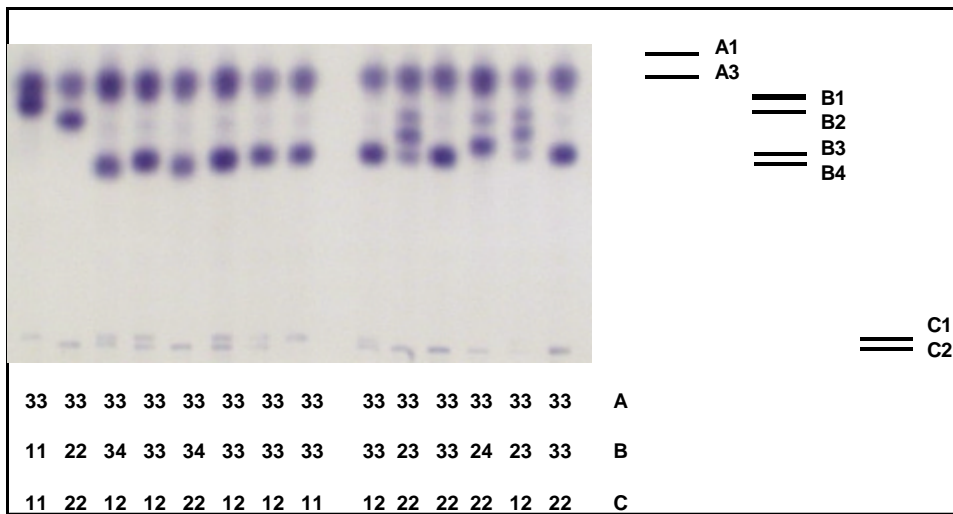
### Isocitratdehydrogenase (IDH) E.C.1.1.1.42



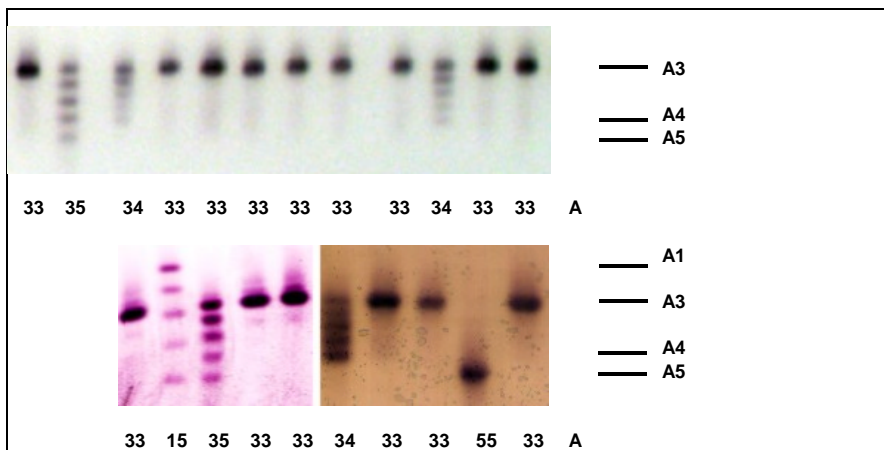
### Leucinaminopeptidase (LAP) E.C.3.4.11.1



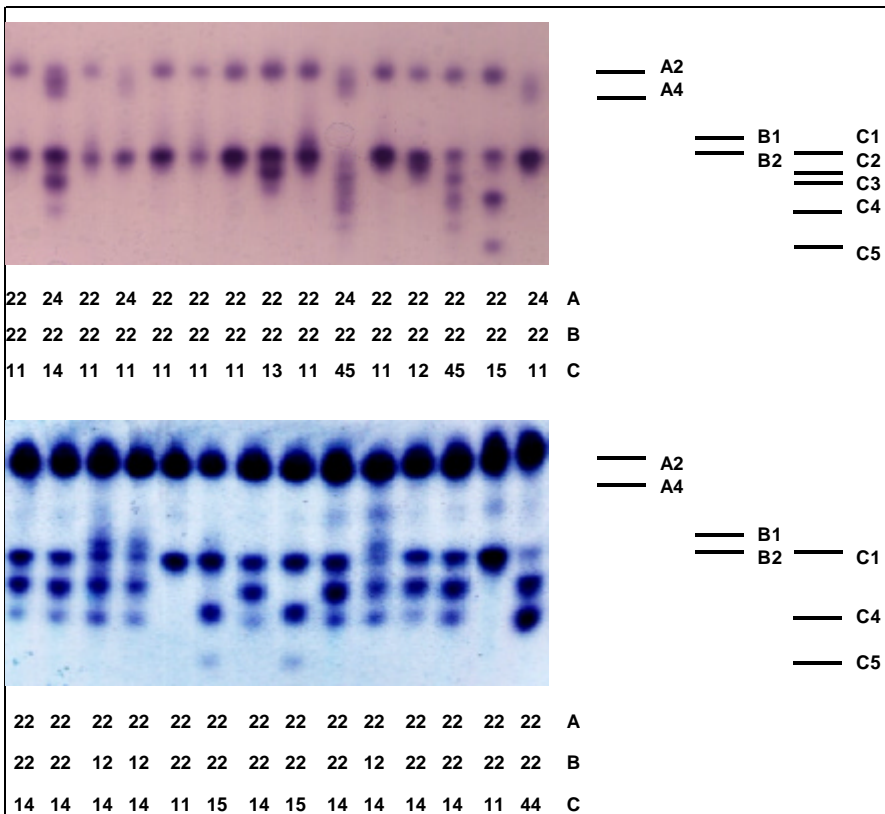
### Malatdehydrogenase (MDH) E.C.1.1.1.37



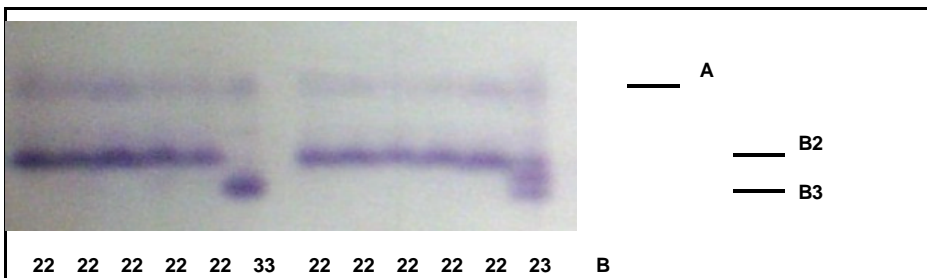
### Menadionreduktase (MNR, DIA) E.C.1.6.99.2



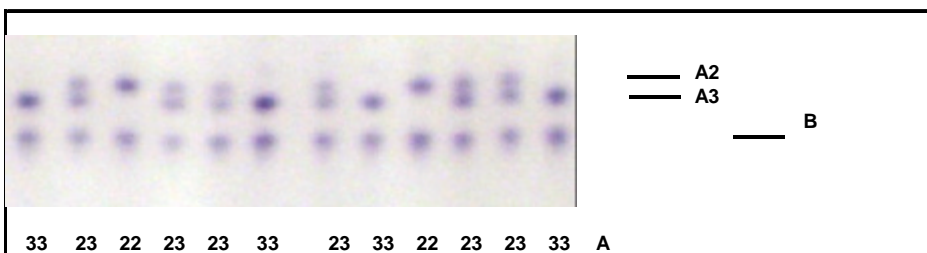
### 6-Phosphogluconatdehydrogenase (6-PGDH) E.C.1.1.1.44



### Phosphoglucose-Isomerase (PGI) E.C.5.3.1.9



### Phosphoglucomutase (PGM) E.C.2.7.5.1



**Shikimatdehydrogenase (SKDH) E.C.1.1.1.25**

