Histochemie 21, 17—20 (1970)

Artefakte im Amylase-Substratfilmtest

H. W. Denker

Anatomisches Institut der Universität Marburg a. d. Lahn (Direktor: Prof. Dr. G. Petry) und Arbeitsgruppe Prof. Dr. G. H. M. Gottschewski am Max-Planck-Institut für Immunbiologie Freiburg i. Br.

Eingegangen am 18. Oktober 1969

Artifacts in the Substrate Film Test for Amylase

Summary. In substrate film tests for amylase, periodate-oxidized starch films (Shear and Pearse, 1963) may produce artifacts, for they undergo spontaneous hydrolysis at slightly alkaline pH levels. This is concluded from observations made on rabbit blastocysts.

Zusammenfassung. Bei der Verwendung von perjodsäureoxydierten Stärkefilmen (Shear und Pearse, 1963) zum Amylasenachweis können Artefakte entstehen durch alkalische, nichtenzymatische Hydrolyse in Geweben mit hohem pH. Dies wird anhand von Beobachtungen an Kaninchen-Blastozysten erläutert.

Einleitung

Shear und Pearse (1963) haben vorgeschlagen, beim Amylase-Substratfilmtest die Perjodsäure-Oxydation der PAS-Prozedur schon vor der Montage des Schnittes vorzunehmen. Dadurch würden Verfälschungen vermieden, die durch Behinderung der Diffusion der Perjodsäure durch den Schnitt hindurch entstehen können. Stärkefilme werden auch nach Perjodsäure-Oxydation durch Amylase leicht hydrolysiert, was ich bestätigen kann (vgl. Abb. 3). Dieses Verfahren kann aber leicht zu einer anderen Art von Artefakten führen: Nach der Oxydation sind die Ausstriche sehr leicht alkalisch (nichtenzymatisch) hydrolysierbar. So können sie im Bereich einiger Strukturen allein infolge des dort herrschenden hohen pH abgebaut werden. Zu diesem Schluß führen Beobachtungen an Kaninchen-Blastozyten, die hier geschildert werden sollen.

Material und prinzipielle Ausführung

Verwendet wurden Stärke-Präparationen für die Stärkegelelektrophorese. Die Ausstriche wurden nach der Methode von Tremblay (1963) hergestellt. Einige kamen zur Oxydation für 5—10 min in 0,5%ige wäßrige Perjodsäurelösung (*w/v*); anschließend Auswaschen in fließendem Leitungswasser mindestens 20 min, 2 × Aqua dest., Lufttrocknung.

Prinzipielle Ausführung. Kryostat-Nativschnitte durch Uterus und Blastozyste des Kaninchens 7 Tage post coitum (7 d p.c.) wurden direkt auf den Substratfilmen montiert. Inkubation in feuchter Kammer bei 37° C. Färbung: oxydierte Filme mit Schiffschem Reagenz, nichtoxydierte mit der vollen PAS-Prozedur.

Beobachtungen und Diskussion

Mit nicht oxydierten Substratfilmen ist, abgesehen vom Inhalt großer Gefäße, keinerlei Amylase-Aktivität nachweisbar (Abb. 1). Bei Verwendung von oxydierten Filmen sieht man aber einen Abbau im Bereich der Blastozystenflüssigkeit (Abb. 2).

Abb. 1. Kaninchen-Blastozyste im Uterus, 7 d p.c. Schnitt auf nichtoxydiertem Stärkefilm montiert; Inkubation 1 Std bei 37°C. PAS, Hämalaun. 9×. Keine Aktivität des Keims

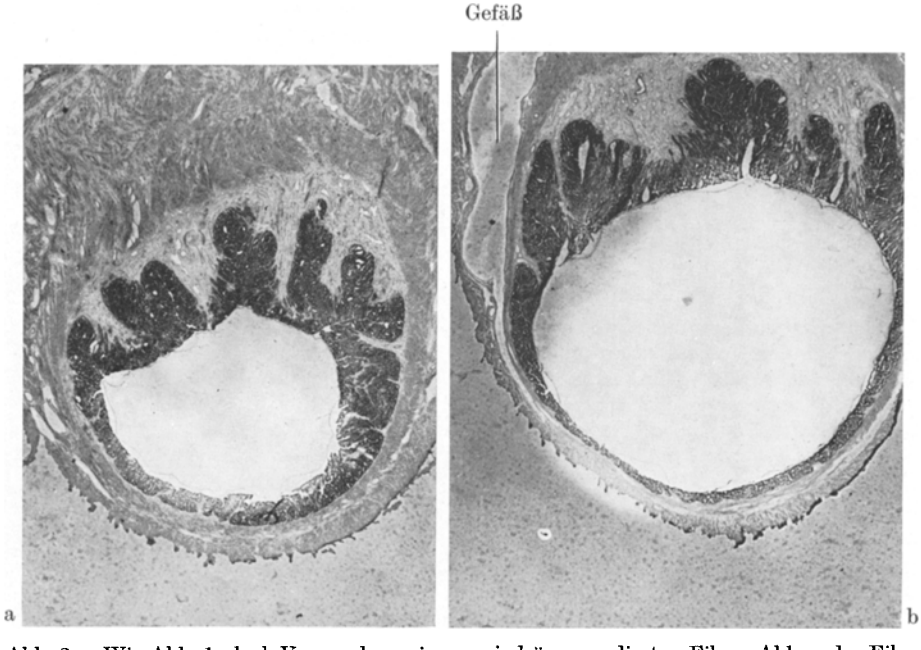

Abb. 2. a Wie Abb. 1, doch Verwendung eines perjodsäureoxydierten Films. Abbau des Films im Bereich der Blastozystenflüssigkeit. b wie Abb. 2a; größerer Keim. Beachte auch die Aufhellungen im Bereich eines großen Gefäßes (links im Bild)

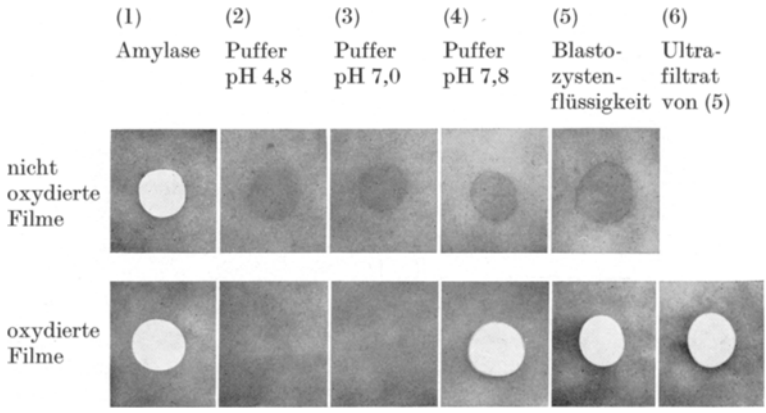

Abb. 3. Wirkung aufgetropfter Testflüssigkeiten [(*1*)—(*6*)] auf normale (obere Reihe) bzw. mit Perjodsäure oxydierte (untere Reihe) Stärkefilme. Inkubation in feuchter Kammer 1 Std bei 37°C. Färbung: PAS bzw. Schiff. Näheres s. Text

Diese Aktivität des Keims demonstriert zunächst einige Eigenschaften, die sich gut mit der Vorstellung vereinen lassen könnten, daß es sich um einen *enzymatischen Faktor* handele: 1. Die Reaktion benötigt eine merkliche Zeit: Erste Anzeichen nach 10 min Inkubation bei 37°C, volle Ausprägung nach 40 min. 2. Sie wird durch Temperaturerhöhung auf 37°C gegenüber Zimmertemperatur begünstigt. 3. Das wirksame Agens ist zwar leicht diffusibel (es läßt sich durch Spülen der montierten Schnitte in NaCl-Lösung u. a. beseitigen); es bleibt aber bei Inkubation in 30% Saccharoselösung nachweisbar. So kann man zeigen, daß es durch saure Puffer gehemmt wird.

Daß tatsächlich ein *Abbau des Films* und nicht etwa eine Blockade der Aldehydgruppen erfolgte, zeigen folgende *Kontrollen:* 1. Färbung mit Lugolscher Lösung (anstelle von Schiffschem Reagenz) ergibt ein gleiches Bild. 2. Nochmalige Perjodsäure-Oxydation nach der Inkubation ändert nichts am negativen Ausfall der Schiff-Färbung im Bereich des Blastozystenlumens. 3. Sulfatierung nach der Inkubation (verwendet wurde meist ein Gemisch aus konzentrierter H_2SO_4, Essigsäureanhydrid und Äther, s. Pearse, 1960, S. 835) verleiht dem Film eine starke Färbbarkeit mit Toluidinblau bei pH 1,5 mit Ausnahme des PAS-negativen Bereichs des Blastozystenlumens. Das bedeutet, daß hier keine reagiblen Hydroxylgruppen mehr vorhanden sind. 4. Die körnige Struktur der Filme ermöglichte auch ohne Färbung die Beobachtung, daß sie abgebaut werden.

Dieser Abbau der perjodsäureoxydierten Stärkefilme durch die Blastozystenflüssigkeit ist jedoch wahrscheinlich nicht auf einen enzymatischen Faktor, sondern auf einen *Effekt des* dort sehr hohen *pH* zurückzuführen. Dieser pH steigt beim Stehen an der Luft durch CO_2-Verlust schnell auf Werte über 8 an (vgl. Cecilia Lutwak-Mann, 1959; Böving, 1963; Zimmermann, 1965, 1966; Petzoldt). Für einen pH-Effekt spricht folgendes:

1. Perjodsäureoxydierte Filme sind *gegenüber alkalischem pH sehr labil* im Gegensatz zu nichtoxydierten Filmen. Erstere werden durch Puffer von pH 7,6 bis 7,8 bei 37°C vollständig hydrolysiert (schneller bei pH 8,0; angedeutet schon

bei pH 7,3) (Versuche mit Veronalazetat-, Phosphat- und Glycin-Bikarbonat-Puffer, vgl. Abb. 3). Schon ein dünnes Auftragen von Puffer auf den Film genügt. Gegenüber saurem und neutralem pH (4,0—7,0) sind die Filme dagegen unter diesen Bedingungen stabil (Abb. 3). 2. Der Effekt der Schnitte der Keime und der der Puffer tritt besonders schnell (schon nach 2 min) auf bei Erhitzen auf 90°C. Die meisten Enzyme werden dadurch inaktiviert. 3. Eine Inaktivierung durch die Dämpfe von Methanol, Äthanol und Formol ist nicht möglich. 4. Versuche mit Ultrafiltraten von Blastozystenflüssigkeit zeigten, daß die Aktivität auf *niedermolekulare Bestandteile* zurückgeht. Die Ultrafiltrate wurden mit Zellulosenitrathülsen (Selecta Ultra Hülsen Nr. 100; Porenweite etwa 5 mμ) hergestellt. Sie hydrolysierten die oxydierten Stärkefilme in der gleichen Weise wie komplette Blastozystenflüssigkeit (Abb. 3). Einstellen des pH auf saure Werte hemmte die Reaktion.

Es erscheint daher gerechtfertigt, den Abbau perjodsäureoxydierter Stärkefilme durch die Blastozystenflüssigkeit des Kaninchens als nichtenzymatische alkalische Hydrolyse zu deuten. Da eine solche Hydrolyse schon bei physiologischen pH-Werten möglich ist, ist die Anwendung oxydierter Filme grundsätzlich problematisch.

Literatur

Böving, B. G.: Implantation mechanisms. Conference on Physiological Mechanisms Concerned with Conception (Hartman, C. G., ed.), p. 321—396. New York: Pergamon Press 1963.

Lutwak-Mann, Cecilia: Biochemical approach to the study of ovum implantation in the rabbit. Mem. Soc. Endocrinol. **6**, 35—49 (1959).

Pearse, A. G. E.: Histochemistry. Theoretical and applied. London: Churchill 1960.

Petzoldt, U.: Untersuchungen über die Ionenverhältnisse in Uterus und Blastozyste des Kaninchens (Oryctolagus cuniculus). Diss. Nat. Fak. Marburg a. d. Lahn (in Vorbereitung).

Shear, M., Pearse, A. G. E.: A starch substrate film method for the histochemical localization of amylase. Exp. Cell Res. **32**, 174—177 (1963).

Tremblay, G.: The localization of amylase activity in tissue sections by a starch film method. J. Histochem. Cytochem. **11**, 202—206 (1963).

Zimmermann, W.: Experimentelle Untersuchungen über die Beziehungen zwischen Keim und Umwelt beim Kaninchen. Arzneimittel-Forsch. **15**, 1029—1035 (1965).

— Die Bedeutung der Nidation beim Säugetier für die immunologische Toleranz zwischen Mutter und Fet. Naturw. Rdsch. **19**, 18—21 (1966).

Dr. H. W. Denker
Max-Planck-Institut für Immunbiologie
7800 Freiburg i. Br.
Stefan-Meier-Str. 8