

3 ERGEBNISSE

Um zu überprüfen, ob enzymatische Analysen auch mit immobilisierten Enzymen durchführbar sind, wurden diese mit Modellsubstraten inkubiert. Nachfolgend werden MALDI-Massenspektren der Substratlösungen vor und nach der Inkubation mit immobilisierten Enzymen gezeigt.

3.1 Versuch zum Nachweis der enzymatischen Aktivität von immobilisierter alkalischer Phosphatase

Um die enzymatische Aktivität der an aktivierte Affinitätschromatographie-Gelpartikel gebundenen alkalischen Phosphatase zu testen, wurde sie mit dem CoenzymA-Glutathion-Disulfid (CoASSG) inkubiert. Die Abbildung 8 zeigt das Spektrum von CoASSG vor der Inkubation mit der immobilisierten alkalischen Phosphatase. In der Abbildung 9, die das CoASSG Spektrum nach der Inkubation zeigt, kommt ein Signal mit der Molekülmasse 993.55 Da vor. Die Differenz zur CoASSG-Molekülmasse von 1073.67 Da beträgt 80 Da, was genau einem Phosphatrest entspricht. Das bedeutet, dass durch die Inkubation mit der alkalischen Phosphatase die endständige Phosphatgruppe von CoASSG abgespalten wurde.

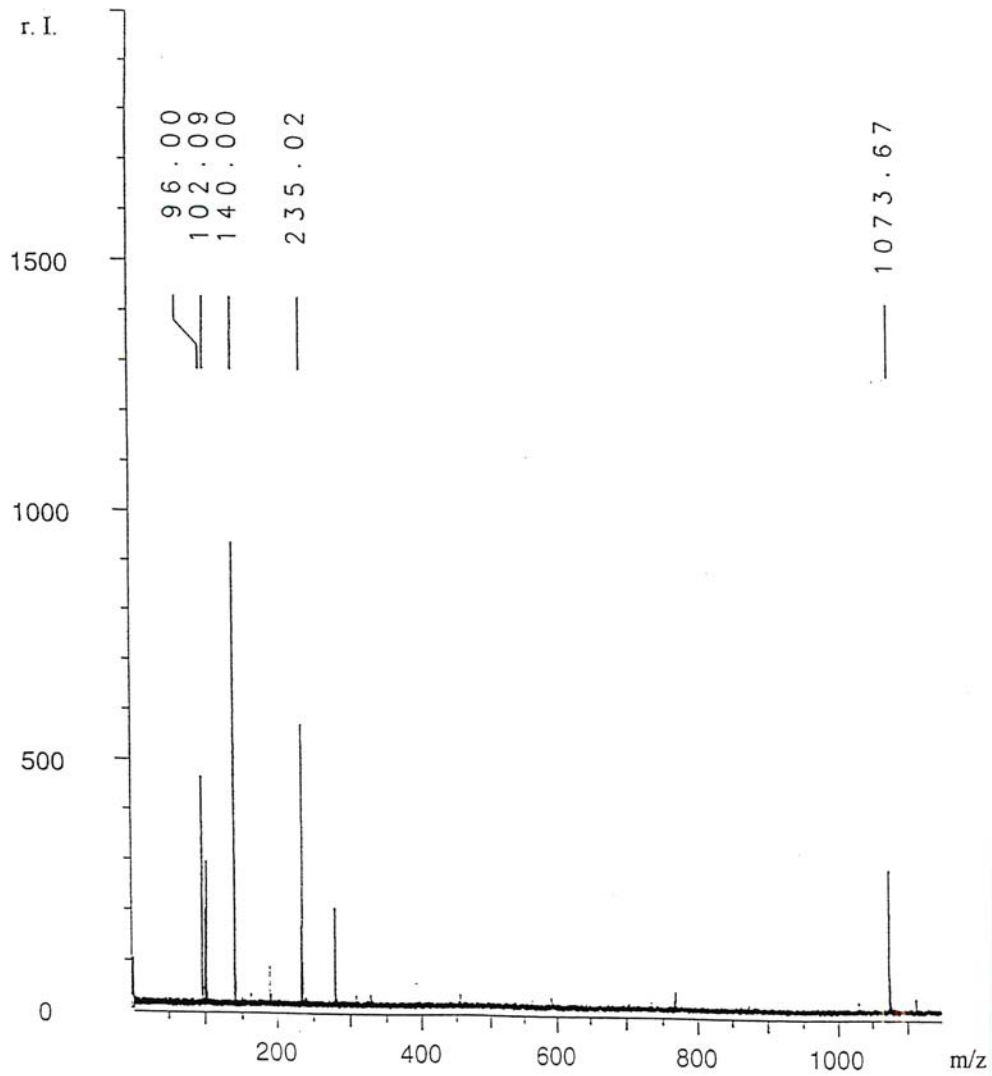


Abb. 8: MALDI-Massenspektrum von CoASSG vor der Inkubation mit der immobilisierten alkalischen Phosphatase

Abszisse: Massenzahl pro Ladung (m/z)

Ordinate: relative Intensität (dimensionslos)

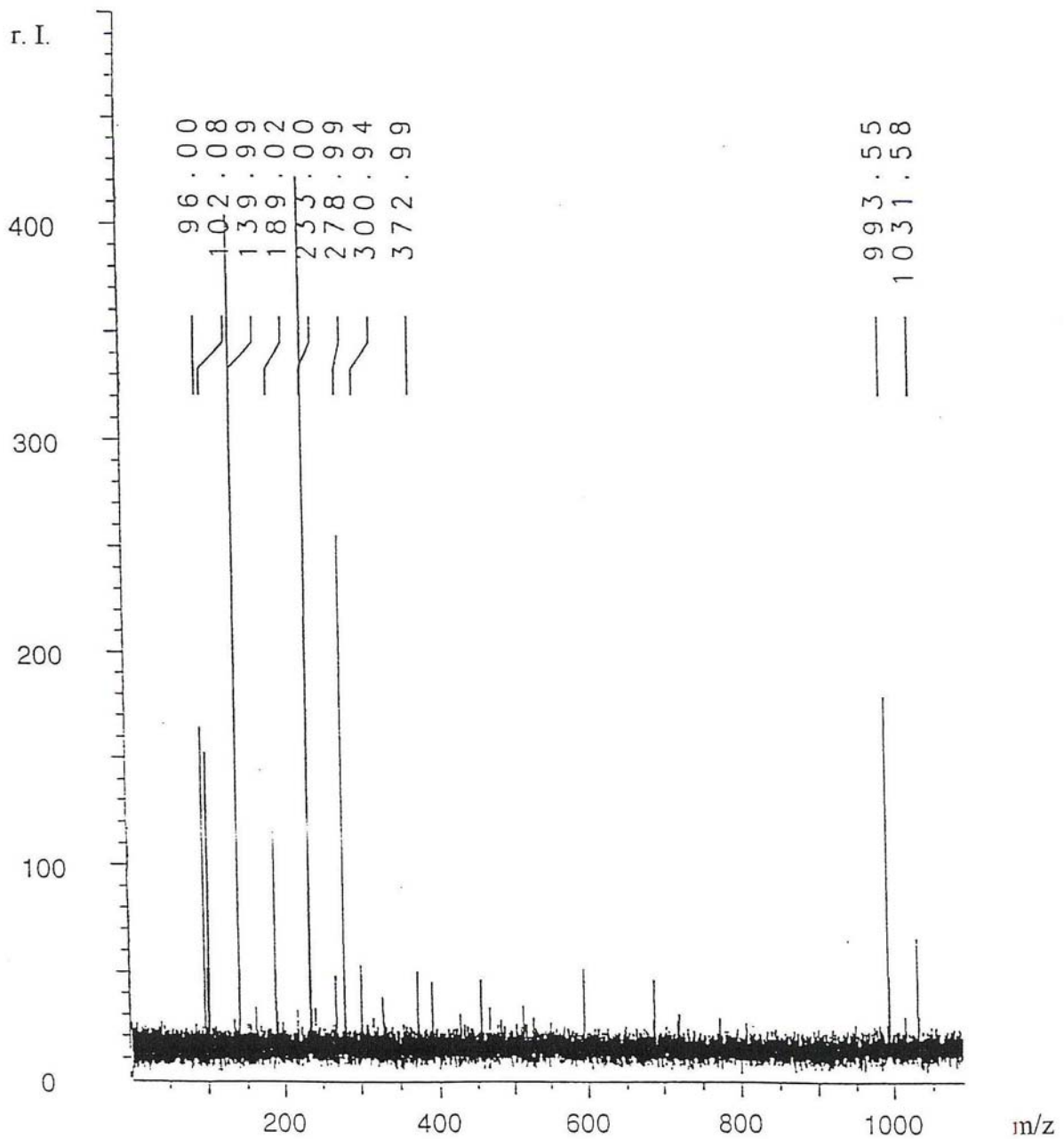


Abb. 9: MALDI-Massenspektrum von CoASSG nach der Inkubation mit der alkalischen Phosphatase.

Abszisse: Massenzahl pro Ladung (m/z)

Ordinate: relative Intensität (dimensionslos)

Die nachfolgenden Tabellen zeigen Interpretationen der in den MALDI-Massenspektren enthaltenen Signale auf. Mit der gewählten experimentellen Messanordnung wurden vorrangig protonierte Molekülonen detektiert. Das eigentliche Molekulargewicht ergibt sich deshalb durch Subtraktion von 1 von dem m/z-Wert des zu interpretierenden Signals. Eine Variationsbreite von ± 2 der gemessenen Masse wurde dem Vergleich zugrunde gelegt.

| Masse des gemessenen Fragments $[M+H]^+$ | Interpretation des gemessenen Fragments | Masse des berechneten Fragments $[M+H]^+$ |
|--|---|---|
| 96.00 | HPA – CO ₂ | 96.0 |
| 140.00 | HPA | 140.0 |
| 235.02 | HPA + [HPA – CO ₂] | 236.0 |
| 1073.67 | CoASSG | 1073.8 |

Tab. 1 Interpretationen der Signale im MALDI-Massenspektrum der Abbildung 8.

| Masse des gemessenen Fragments $[M+H]^+$ | Interpretation des gemessenen Fragments | Masse des berechneten Fragments $[M+H]^+$ |
|--|---|---|
| 96.00 | HPA – CO ₂ | 96.0 |
| 139.99 | HPA | 140.0 |
| 189.02 | 2 HPA – 2 CO ₂ | 190.0 |
| 233.00 | 2 HPA – CO ₂ | 232.8 |
| 278.99 | 2 HPA | 278.0 |
| 595.00 | ? | ? |
| 993.55 | dephospho-CoASSG | 993.8 |

Tab. 2 Interpretationen der Signale im MALDI-Massenspektrum der Abbildung 9.