J. Clin. Chem. Clin. Biochem.
Vol. 21, 1983, pp. 151–155

Bestimmung von Protein im Liquor: Vergleich der Coomassie-Blau-Methode mit dem Cu-Folin-Differentialtest

Von R. Schnell, Silvia Jegge und H. P. Rieder

Klinisch-chemisches Laboratorium, Kantonsspital Basel

(Eingegangen am 28. Mai/22. Oktober 1982)

Zusammenfassung: Ein Vergleich der Impräzision „in der Serie“ und „von Tag zu Tag“ bei Bestimmungen an Kontrollproben und 96 zufällig verfügbaren Liquorproben des Routinelaboratoriums ergibt, daß der Cu-Folin-Differentialtest und die Coomassie-Brilliantblau-Methode von Bio-Rad zur Bestimmung des Totalproteingehaltes im Liquor etwa gleichwertig sind. Möglicherweise auftretende Probleme bei sehr niedrigen Proteinkonzentrationen im Liquor oder Urin sowie Einflüsse von in der neurologischen Praxis gebräuchlichen Medikamenten werden vorgestellt und diskutiert.

Determination of protein in cerebrospinal fluid:

Comparison of the Coomassie-Blue method and the Cu-Folin differential test

Summary: Comparison of within-run and between-day imprecision of protein assays using CSF controls as well as 96 random CSF samples from the routine laboratory shows that the Cu-Folin differential test and the Coomassie-Brilliant-Blue method from Bio-Rad are equally suited to total protein determination in cerebrospinal fluid. Problems possibly arising with very low concentrations of CSF or urine protein and the influence of some drugs often used in the neurological clinic are presented and discussed.

Einführung

Nachdem wir in früheren eigenen Versuchen mit Coomassieblau, später dann mit ersten käuflichen Reagenzien keine genügende Farbkonzanz zur sicheren Erfassung der Proteinkonzentrationen erzielen konnten, liegt heute nun eine Reagenzienformulierung der Firma ECS-Bio-Rad vor, mit welcher bessere Ergebnisse erhalten werden.

1976 hat Bradford (1) diese Methode zur Bestimmung kleinster Proteinmengen vorgeschlagen. Inzwischen haben sich mehrere Autoren (2–7) erfolgreich mit deren Verbesserung und Anwendung zur Bestimmung von Liquor- und Urinprotein befaßt. Andere (8) sind von den Eigenschaften und der Zuverlässigkeit dieses Farbtestes nicht befriedigt.

Wie der nachfolgende Vergleich von 96 Liquorproben und zugehörigen Qualitätskontrollen zeigt, gibt

die Bestimmung mit der Coomassie-Brilliant-Blau-Methode von Bio-Rad weitgehend gleiche Werte des Totalproteins wie der in unserem Liquor-Laboratorium seit bald zwei Jahrzehnten übliche Cu-Folin-Differentialtest nach Rieder (10, 11).

Methoden

Bio-Rad-Test mit Coomassie-Brilliant-Blau

Proteine bilden mit Coomassie-Brilliant-Blau G250 in saurer Lösung sofort einen Komplex, wobei das Absorptionsmaximum des Farbstoffes von 465 auf 595 nm verschoben wird. Der Absorptionsertrag bei 595 nm ist der Menge des gebundenen Proteins bis zu etwa 1000 mg/l proportional.

Als Standard dient neuerdings eine Proteinmischung von 0,7 Gewichtsteilen humanem Albumin und 0,3 Gewichtsteilen humanem γ -Globulin (also nicht Albumin allein und nicht Proteine vom Rind!). Gemäß Anleitung im Firmenprospekt (ECS-Bio-

Rad 1980 (9)) enthält nach vorgeschriebener Verdünnung die Reagenziengebrauchslösung im Liter:

100 mg Coomassie-Brilliant-Blau G250

0,05 Volumenteile Methanol 18,4 mol/l (95%)

0,10 Volumenteile *o*-Phosphorsäure 15 mol/l (85%).

100 µl Probe und 5 ml Reagens werden 10 min nach sorgfältiger Mischung bei 595 nm abgelesen (9). Die Referenzwerte für Lumballiquoren werden von verschiedenen Autoren etwas unterschiedlich, teils mit 100–600 mg/l (2), teils mit 90–460 mg/l (4) oder 150–450 mg/l (9) angegeben.

Cu-Folin-Differentialtest

Dieser beruht auf der Lowry'schen Cu-Folin-Reaktion in der erweiterten Modifikation von Rieder (10, 11). Vorerst handelt es sich um eine 2stufige Reaktion, deren zweiter Schritt durch Fremdeinflüsse (vor allem phenolische Substanzen) gestört werden kann:

Das Prinzip des Differentialtests besteht darin, daß der Ansatz (0,1 ml Probe + 5,5 ml Reagens) stets im Doppel ausgeführt wird, einmal mit Zusatz des Cu^{II} -Salzes und einmal ohne. Im ersten Ansatz reagieren *alle* Farbgeber zum intensiven, bei 750 nm optimal meßbaren Molybdänblau, im zweiten Ansatz (ohne Cu) nur die möglichen Fremdschubstanzen in der Sekundärreaktion (z.B. gewisse Medikamente). Bildet man durch Subtraktion der zweiten von der ersten Messung die Differenz der identischen Proben, so erhält man den Farbanteil des reinen Proteins (Primärreaktion). Dieser kann anhand einer entsprechend behandelten Standardlösung ausgerechnet werden.

Als Standard dient auch in dieser Methode seit jeher eine Proteinsmischung, und zwar 0,6 Gewichtsteile humanes Albumin (Behring) und 0,4 Gewichtsteile humanes γ -Globulin (Behring), da der durchschnittliche, mittels Agarelektrophorese nach Wieme (17) ermittelte Albuminanteil unserer Referenzpersonen um 0,63 liegt, derjenige von Patienten oft auch niedriger. Die Differentialmethode umfaßt einen Bereich von 0–1500 mg/l; da die erhaltene Standardkurve eine ganz leichte Biegung aufweist, interpolieren wir die gemessenen Absorptionen zur Umrechnung in Konzentrationen abschnittsweise mit Hilfe eines Tischcomputers (15).

Die Referenzwerte für Lumballiquoren liegen zwischen 180–410 mg/l, diejenigen für suboccipitale Liquoren um 17% tiefer (15).

Resultate

Präzision der Methoden

Die berechneten Kenngrößen sind in Tabelle 1 zusammengestellt. Aufgrund der relativ großen Zahl vergleichbarer Werte kommen wir zur Überzeugung, daß die beiden Methoden hinsichtlich ihrer Präzision in der Serie und von Tag zu Tag nicht wesentlich voneinander abweichen.

Hingegen können wir die Firmenangabe (9), daß der Coomassie-Brilliant-Blau-Test viermal empfindlicher sein soll als die Lowry-Reaktion, nicht bestätigen, wenn wir auf unsere Modifikation dieses Tests (10, 11) abstellen. Aus dem Vergleich des in beiden Methoden verwendeten Fisher-Control-Liquors geht hervor, daß dieser in gleicher Endverdünnung des Reaktionsvolumens (5,1 ml) in der primären Cu-Folin-Reaktion eine Absorption von 0,219, mit Coomassieblau eine solche von 0,365 ergibt, daß der Empfindlichkeitsgewinn mit dem Coomassie-Brilliant-Blau-Test also bestenfalls einen Betrag zwischen 1,5–2 erreicht (hier 1,7).

Liquorproteinbestimmung

96 Proben einer Serie konsekutiv im Routinelabor eintreffender Liquoren, bei denen genügend Material zur Verfügung stand, wurden gleichzeitig mittels beider Methoden bestimmt. In den vorliegenden Vergleich einbezogen wurden die effektiv gemessenen Konzentrationen, ohne allfällige Aufrechnungen mit Verdünnungsfaktoren (5 Fälle) zu berücksichtigen.

Von früheren Untersuchungen her ist bekannt (10, 11), daß der Cu-Folin-Differentialtest auf Globuline etwas stärker reagiert als auf Albumine. Für labor-diagnostische Zwecke erachteten wir dies als Vorteil, sind doch die meisten pathologischen Veränderungen mit einer Vermehrung von Globulinen verbunden, welche dadurch umso rascher angezeigt

Tab. 1. Präzision des Cu-Folin-Differentialtests und der Coomassie-Brilliant-Blau G250-Methode.

Proben und Proteinkonzentration*) (mg/l)	Cu-Folin-Differentialtest			Coomassieblau-Methode		
	N	$\bar{x} \pm s$ (mg/l)	VK (%)	N	$\bar{x} \pm s$ (mg/l)	VK (%)
<i>In der Serie</i>						
Albumin-Kontrolle (620)	88	632 $\pm$ 10,6	1,67	—	—	—
Fisher-Control (410)	43	392 $\pm$ 9,4	2,39	40	400 $\pm$ 11,0	2,75
Bio-Rad-Kontrolle (850)	—	—	—	40	787 $\pm$ 19,5	2,47
<i>Von Tag zu Tag</i>						
Albumin-Kontrolle (620)	90	637 $\pm$ 21,2	3,32	—	—	—
Fisher-Control (410)	86	400 $\pm$ 12,4	3,09	80	399 $\pm$ 12,5	3,13
Bio-Rad-Kontrolle (850)	—	—	—	80	787 $\pm$ 17,1	2,17

*) laut Firmenangabe resp. Einwägung

wird. Für Vergleichsuntersuchungen können daraus jedoch Abweichungen resultieren, wenn die Coomassie-Brilliant-Blau-Methode nicht oder im umgekehrten Sinn dem Albumin/Globulin-Verhältnis unterworfen ist (3, 8). 2 der 96 Probenwerte fallen bei der Korrelation der Ergebnisse als Ausreißer auf (Test for Outliers nach F. E. Grubbs (12), Olivetti-Programm Nr. 9200101). Da wir von beiden Patienten keine Liquorelektrophorese besitzen, anhand welcher wir Albumin-Globulin-Veränderungen hätten beurteilen können und kein Liquor zur Wiederholung der Tests übrigblieb, sind diese zwei Werte aus der nachfolgenden Statistik ausgeschlossen. Abbildung 1 gibt die Korrelation und Regression der Vergleichsbestimmungen wieder. Mit $r = 0,981$ ($F = 2321,3$), resp. $r = 0,984$ ($F = 2793,2$) im logarithmischen Maßstab, ergibt sich eine sehr gute Korrelation und eine Regressionsgerade, die nahezu mit der Winkelhalbierenden zusammenfällt. Die Meßwerte des Patientenkollektivs lauten für die Coomassie-Brilliant-Blau-Methode

$\bar{x} \pm s = 512 \pm 274 \text{ mg/l}$ ($\log = 2,661 \pm 0,198$)

und für den Cu-Folin-Differentialtest

$\bar{y} \pm s = 505 \pm 272 \text{ mg/l}$ ($\log = 2,652 \pm 0,205$).

Abb. 1. Vergleichende Totalproteinbestimmung von 96 Liquoren mittels Coomassieblau-Reaktion und Cu-Folin-Differentialtest.

+ = zwei nicht wiederholbare Ausreißer (Materialmangel)

--- = dreifacher Standardfehler der Residuen ($s_{y,x}$)

Regression (logarithmisch):

$$y = -0,111 + 1,038 x$$

$$r = 0,984$$

Da es sich um ein willkürliches Probenkollektiv mit teilweise pathologischen Werten handelt, weist dieses keine symmetrische Verteilung der Werthöhen auf. Erst durch Logarithmieren der Werte wird eine nahezu normale Verteilung erhalten. Der statistische Vergleich der beiden Methoden, bei welchem wir die Empfehlungen von Haeckel (13, 14) zur Berechnung der multivariaten Abhängigkeiten beachteten, erfolgte daher an den logarithmierten Werten. Die so erhaltenen Ergebnisse sind in Tabelle 2 zusammengestellt.

Tab. 2. Steigung und statistische Signifikanz (Probenwerte in mg/l, logarithmisch, $n = 94$).

Methoden und Proteinkonzentration (mg/l):	Coomassie-Brilliant-Blau-Test	Cu-Folin-Differentialtest
Mittelwerte	$\bar{x} = 2,6613$	$\bar{y} = 2,6525$
Differenz $\bar{x} - \bar{y}$		$\bar{d} = 0,0088$
Signifikanz (gepaarter t-Test)		$t = 2,31$ ($P \sim 0,02$)
Standardfehler der Residuen		$s_{y,x} = 0,0262$
Steigung der standardisierten Hauptkomponente (b)		$b = 1,038$
Interzept (a)		$a = -0,1111$
Unterschied der Steigung von 1,00 (t-Test nach l.c. (14))		$t = -2,02$ ($P \sim 0,05$)

kursiv = Kenngrößen der Signifikanzrechnung

Medikamenteinflüsse

Eine Auswahl der in unserer neurologischen Klinik am häufigsten verwendeten Medikamente wurde modellmäßig auf ihre Reaktionsfähigkeit in beiden Methoden überprüft. Zum weiteren Vergleich ist zudem noch die einfache Cu-Folin-Methode (ohne Differentialansatz) in der zusammenfassenden Tabelle 3 angegeben. Die Erfassungsgrenze ($2 \times SD$), ermittelt aus 19 Doppelbestimmungen von Liquoren mit relativ niedrigen Proteinkonzentrationen ($<300 \text{ mg/l}$), beträgt für die Coomassie-Brilliant-Blau-Methode $15,4 \text{ mg/l}$, für den Cu-Folin-Differentialtest $14,0 \text{ mg/l}$. Werte unter 15 mg/l sind deshalb unzuverlässig und könnten ebensogut gleich Null sein.

Die im Test verwendeten Konzentrationen sind theoretisch; sie würden vielleicht etwa der anfänglichen Maximaldosis im Serum entsprechen. Natürlich wird im Liquor immer nur ein meist minimaler Bruchteil dieser Medikamentkonzentration erreicht. Umso geringfügiger werden dann die zu erwartenden Störungen sein.

Tab. 3. Fragliche Medikamenteneinflüsse bei der Totalproteinbestimmung: Vergleich des Cu-Folin-Differentialtests mit der Coomassieblau-Methode von Bio Rad.

Medikament	Klinisch applizierte Höchstkonzentration bei Annahme eines Verdünnungsvolumens von 3 l*	Gemessene Proteinäquivalente in mg/l**)		
		Cu-Folin-Reaktion: ein-fach	Differentialtest	Coomassieblau-Methode
Carbasalat-Calcium (Alcacyl)	100 mg/l	288	0	18
Diclofenac-Natrium (Voltaren)	33 mg/l	33	10	15
Indometacin (Indocid)	50 mg/l	2	0	16
Baclofen (Lioresal)	33 mg/l	6	6	21
Prednisolon	330 mg/l	13	0	13
Valproinsäure (Depakine)	330 mg/l	0	0	31
Carbamazepin (Tegretol)	300 mg/l	0	0	20
Phenobarbital	66 mg/l	4	4	18
Phenytoin	133 mg/l	0	0	13
Digoxin	0,7 mg/l	7	8	15
Propanolol (Inderal)	3 mg/l	9	10	15
Haloperidol (Haldol)	30 mg/l	4	0	17
Diazepam (Valium)	80 mg/l	0	0	18
Chlordiazepoxid (Librium)	33 mg/l	6	6	11
Imipramin (Tofranil)	50 mg/l	151	0	18
Thioridazin (Melleril)	200 mg/l	103	0	53
Phenprocoumon (Marcoumar)	6 mg/l	0	0	14
Mannit	33 mg/l	308	390	16
Penicillin	10000 IE intrathekal d.h. pro 130 ml	39	41	20
Metrizamid (Ampaque)	[I]=100 g/l***)	2	2	16
Lidocain (Xylocain)	100 mg/l	22	12	1

*) mit Modell-Lösungen dieser Konzentration, gelöst in isoton. NaCl (bei Säuren unter Zusatz von etwas NaOH) wurden die Vergleichsbestimmungen ausgeführt (sofern nicht vollständig löslich = gesättigte Lösung).

**) Erfassungsgrenzen: siehe Text.

***) Iodkonzentration pro 1 Kontrastmittellösung.

Diskussion

Die vorliegende Untersuchung zeigt, daß die beiden Methoden etwa die gleiche Präzision aufweisen. Der direkte Vergleich an Liquoren neurologischer Patienten führt ebenfalls zum Eindruck annähernder Gleichwertigkeit, wenn man davon absieht, daß schwach signifikant höhere Werte bei der Coomassieblau-Methode zumindest gruppenstatistisch nachgewiesen werden können.

Im klinischen Einzelfall erscheint dieser minime Unterschied allerdings belanglos, vor allem deshalb, weil bei Liquoren mit zunehmend pathologischen Werten die Übereinstimmung besser wird. Dieser Umstand ist auch aus dem Verlauf der Regressionsgeraden (Abb. 1) ersichtlich; während diese im Bereich um 1000 mg/l die Winkelhalbierende schneidet – also beide Methoden identische Werte geben – weist die Coomassie-Brilliant-Blau-Methode im Bereich sehr kleiner Liquorproteinwerte eine Tendenz zu höheren Werten auf. Die Regressionsgerade geht nicht durch Null, wodurch die Richtigkeit des Analysenwertes sehr niedriger Konzentrationen beeinträchtigt wird. Man darf daraus wohl die Vermutung ableiten, daß die Standardgerade im untersten Teil nicht linear verläuft. Dieser Umstand ist vor allem bei Arbeiten mit Kinderliquoren, deren Proteingehalte häufig niedriger als bei Erwachsenen liegen, wichtig und zu beachten. Er dürfte mit ein Grund sein, daß bei den Medikamentversuchen alle Coomassie-Brilliant-Blau-Werte systematisch um 10–15 mg/l angehoben sind.

Außer diesem Nachteil muß weiterhin berücksichtigt werden, daß der starken Haftfähigkeit des Coomassie-Farbstoffes wegen eigentlich nur mit Wegwerfküvetten von Hand gearbeitet werden sollte oder daß – z.B. mit Methanol – laufend zwischengespült werden muß, was beides vermehrten Zeitaufwand bedeutet. Davon abgesehen ist die Coomassieblau-Methode an sich relativ rasch und stellt etwas geringere Ansprüche an den Berechnungsaufwand. Für die Proteinbestimmung im Urin ist sie der Cu-Folin-Methode sogar vorzuziehen, weil letztere durch die Vielzahl von Fremdstoffen im sehr variablen Milieu des Urins allzu stark gestört wird. Eine erhöhte Ausflockungstendenz des Coomassieblau-Farbstoffes kann allerdings auch hier die Analyse beeinträchtigen, wenn nicht rasch gearbeitet und die Gebrauchslösung häufig filtriert wird.

Aufgrund der weitgehend identischen Ergebnisse beider Methoden im Liquor-Vergleich und unter Berücksichtigung der tendenziell etwas höheren Werte der Coomassie-Brilliant-Blau-Methode bei geringem Totalproteingehalt müßten wir in Anlehnung an unsere eigenen Werte des klinisch-normalen Referenzkollektivs (15) für die Coomassieblau-Methode die folgenden „Referenzbereiche“ des Lumballiquors vorschlagen:

Erwachsene 190–420 mg/l,

Kinder 130–400 mg/l (je nach Alter, vgl. Maurer (16)).

Wenn auch Störungen durch Fremdstoffen nie ganz auszuschließen sind, so zeigt doch die Untersuchung der gebräuchlichsten Medikamente, welche in der Neurologischen und Neurochirurgischen Klinik zum Einsatz gelangen, daß von dieser Seite bei beiden Methoden wenig Störeinflüsse zu erwarten sind; einzig Mannit und Penicillin, gegebenenfalls auch Lidocain beim Cu-Folin-Differentialtest sowie Valproinsäure (Depakine) und Thioridazin (Melleril) beim Coomassie-Brilliant-Blau-Test weisen hier etwas kritische Werte auf. Doch dürften solche Konzentrationen im Liquor kaum erreicht werden, mit

Ausnahme des Penicillins, welches direkt intrathekal appliziert wird.

Wägt man alle diese Vor- und Nachteile ab, so darf man feststellen, daß die beiden Methoden hinsichtlich Brauchbarkeit im Routinelabor mehr oder weniger gleichwertig sind und daß es von der spezifischen Fragestellung abhängen wird, für welche der beiden man sich entscheidet, sofern man nicht die sowohl apparativ wie bezüglich Reagenzien bedeutend teureren immunochemischen Analysemethoden vorzieht.

Literatur

1. Bradford, M. M. (1976) *Anal. Biochem.* 72, 248–254.
2. McIntosh, J. C. (1977) *Clin. Chem.* 23, 1939–1940.
3. Johnson, J. A. & Lott, J. A. (1978) *Clin. Chem.* 24, 1931–1933.
4. Pierce, J. & Suelter, C. H. (1977) *Anal. Biochem.* 81, 478–480.
5. Nesbitt, J., Sauer, D. & Culpepper, R. (1978) *J. Amer. Med. Technol.* 40, 278–279.
6. Thomas, L., Winckelmann, M., Michaelis, H. C. & Walb, D. (1981) *J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* 19, 203–208.
7. Miller, N., Mezei, L. M., Gindler, E. M. & Staley, J. (1979) *Clin. Chem.* 25, 1071.
8. Van Wilgenburg, M. G. M., Werkman, E. M. A., van Gorkom, W. H. & Soons, J. B. J. (1981) *J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* 19, 301–304.
9. ECS-Bio-Rad Prospekt 1980, Bio-Rad-Laboratories AG, Kanalstraße 17, CH-8152 Glattbrugg.
10. Rieder, H. P. (1966) *Klin. Wochenschr.* 44, 1036–1046.
11. Rieder, H. P. (1974) in: *Clinical Biochemistry*, Verlag W. de Gruyter, Berlin. S. 1468–1478.
12. Grubbs, F. E. (1950) *Ann. Math. Statist.* 21, 27–58; Olivetti Computer-Programm Nr. 9200101.
13. Haeckel, R. (1982) *J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* 20, 107–110.
14. Feldmann, U., Schneider, G., Klinkers, H. & Haeckel, R. (1981) *J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* 19, 121–137.
15. Jung, P. R., Rieder, H. P. & Jeltsch, C. (1973) *Klin. Wochenschr.* 51, 810–816.
16. Maurer, J. & Rieder, H. P. (1978) *Schweiz. Med. Wochenschr.* 108, 1854–1860.
17. Rieder, H. P., Jung, P. R. & Burri, V. (1972) *Z. Klin. Chem. Klin. Biochem.* 10, 379–384.

Dr. H. P. Rieder
Leiter des Liquor- und Eiweißlabors
Kantonsspital
CH-4031 Basel