

Z. Klin. Chem. Klin. Biochem.  
11. Jg. 1973, S. 456—458

## Protein-Mapping von menschlichen Seren (Isoelektrisches Fokussieren mit anschließender Gelelektrophorese)

Von H.-G. SCHEIL

*Aus dem Institut für Humangenetik und Anthropologie (Direktor: Prof. Dr. H. Schade) der Universität Düsseldorf*

(Eingegangen am 11. Dezember 1972 / 27. Juli 1973)

Mit der Methode des „Protein-Mapping“ lassen sich Humanseren in mindestens 42 Fraktionen auftrennen. Die relativen Wandergeschwindigkeiten der einzelnen Proteine werden für beide Dimensionen angegeben; einzelne Proteine wurden identifiziert. Die Methode eignet sich zur spezielleren Untersuchung pathologischer Seren.

### *Protein mapping of human sera (Isoelectric focusing followed by gel electrophoresis)*

Human blood sera can be separated into at least 42 proteins by the method of "protein-mapping". The relative mobilities in both dimensions had been calculated; some proteins have been identified. The method is suitable for special investigations on pathological sera.

Die Auftrennung der Serumproteine hatte nach Einführung des Polyacrylamid-Gels zu wesentlich mehr Banden als mit herkömmlichen Methoden geführt. Es lag nahe, daß diese einzelnen Banden ihrerseits aus mehreren Fraktionen bestehen. Die von MACKO und STEGEMANN (1) zur Trennung von Kartoffelproteinen verwandte Kombination von isoelektrischem Fokussieren im Polyacrylamid-Gel und einer anschließenden Gelelektrophorese („Protein-Mapping“) wurde zur Trennung von Humanserum-Proteinen von DALE und LATNER (2) sowie von DOMSCHKE et al. (3) angewandt, die mit dieser Methode eine Vielzahl von Fraktionen erhielten. Da für vergleichende Untersuchungen eine nähere Bezeichnung und Charakterisierung nötig ist, wurden 53 Seren (89 Gele) aufgetrennt, die relativen Wanderstrecken der einzelnen Fraktionen berechnet und einzelne Proteine identifiziert.

### Methode

#### Fokussieren

Stammlösung aus 100 g/l Acrylamid, 2,6 g/l N,N'-Methylenbisacrylamid, 100 g/l Saccharose. Gellösung: 6 ml Stammlösung, 30 µl 400 g/l Ampholine pH 5—8 (LKB-Produkte, Bromma, Schweden), 2,4 mg Ammoniumperoxodisulfat, 15 µl N,N,N',N'-Tetramethyläthylendiamin, H<sub>2</sub>O ad 12 ml. Röhrchendurchmesser 5 mm. Das Serum wurde 1:2 mit Saccharoselösung (200 g/l) verdünnt und von dieser Mischung je Röhrchen 50 µl aufgetragen; Überschichtung mit 1 cm einer Lösung aus 100 mg Saccharose, 50 µl Ampholine, H<sub>2</sub>O ad 2 ml. Kathode: Äthanolamin (66,2 mmol/l), Anode: Phosphorsäure (14,8 mmol/l). Lauf im Kühlschränk (4°C), insgesamt 3 h; zunächst bei 2 mA/Röhrchen, bis die Stromstärke auf 1 mA/Röhrchen abgefallen ist (nach etwa 10 min), dann konstant 1 mA/Röhrchen. Dabei steigt die Spannung innerhalb 0,5 h auf etwa 550 V an, die dann konstant gehalten werden.

Anschließend werden die Gele aus den Röhrchen entfernt, 1 min in einer wäßr. Amidoschwarz-10B-Lösung (1 g/l) angefärbt und in der vertikalen Elektrophorese-Einrichtung nach STEGEMANN (4) quer zur Laufrichtung in einen 3 mm starken Gel einpolymerisiert. Plattengel je Kammer aus 7,1 g Acrylamid, 0,375 g N,N'-Methylen-

bisacrylamid, Tris-Borat-Puffer pH 8,9 (0,125 mol/l Tris, 0,0185 mol/l Borsäure) ad 150 ml. Zu 140 ml dieser Lösung 50 mg Na-Sulfit, 0,1 ml N,N,N',N'-Tetramethyläthylendiamin, 58 mg Ammoniumperoxodisulfat (nach STEGEMANN 1970, mündl. Mitteilung). Lauf mit Tris-Borat-Puffer pH 8,9, 1,5 h bei 550 V und 0°C. Färben über Nacht mit Coomassie Blue R 250 (Color Index 42660) nach KOENIG et al. (5), Entfärben in H<sub>2</sub>O/Methanol/Eisessig = 14 ml + 6 ml + 1 ml.

#### Transferrin-Färbung

nach MUELLER et al. (6).

#### Gc-Bestimmung

Der Gc-Bereich zwischen Albumin und den Transferrinen wurde im Gel ausgeschnitten und dann quer zur Elektrophorese-Trennrichtung in 2—3 mm breite Streifen geschnitten. Diese Streifen wurden anschließend in einen Agargel (10 g/l, 1/15 mol/l Phosphatpuffer nach SÖRENSEN, pH 7,1) eingebettet, Diffusion gegen ein spezifisches Anti-Gc-Serum vom Kaninchen (Behring-Werke). Die Überprüfung der Gc-Typen erfolgte mittels einer üblichen Immunelektrophorese. Untersucht wurden für Gc 1—1 und Gc 2—1 je 16 Seren, für Gc 2—2 6 Seren.

### Ergebnisse und Diskussion

Mit der dargestellten Methode des „Protein-Mapping“ lassen sich Humanseren in mindestens 42 Fraktionen auftrennen; es treten jedoch nicht immer alle von ihnen auf, da teilweise Polymorphismus vorliegt (z. B. bei Haptoglobinen und Gc-Proteinen). Die von DOMSCHKE et al. (3) gefundenen rund 90 Flecken konnten wir auch mit der von ihnen angegebenen Methode nicht nachweisen, das damit erhaltene Muster entsprach weitgehend dem unter unseren Bedingungen. In Abbildung 1 sind die Fraktionen eines Normalserums und eines pathologischen Serums (posthepatitische Lebercirrhose) nach zweidimensionaler Auftrennung dargestellt. Der Vergleich zeigt, daß bei der Cirrhose im Immunglobulinbereich zusätzliche Fraktionen auftreten, deren Natur noch nicht bekannt ist. Abbildung 2 und Tabelle 1 zeigen die gemittelten Werte aller untersuchten Seren. Für die Ordinate wurde die Wanderstrecke des

Tab. 1

Relative Wanderstrecken der Fraktionen 1—42. Quer: isoelektrisches Fokussieren, hoch: Gelelektrophorese. n = Zahl der für die betreffende Fraktion ausgewerteten Gele. Angegeben sind, wie auch im Text, die Mittelwerte mit ihren mittleren Fehlern ( $\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$ )

Fraktion Nr.	quer	hoch	n	Fraktion Nr.	quer	hoch	n	Fraktion Nr.	quer	hoch	n
1	100	4,8 ± 0,2	51	11	60,4 ± 1,3	24,4 ± 0,3	48	27	46,6 ± 1,6	53,6 ± 0,4	30
2	96,3 ± 0,3	9,0 ± 0,5	35	12	54,8 ± 1,4	27,5 ± 0,4	43	28	64,5 ± 1,5	64,6 ± 0,3	66
2a	96,0 ± 0,4	11,4 ± 0,8	10	13	49,3 ± 1,7	29,5 ± 0,4	36	29	58,0 ± 1,6	65,4 ± 0,3	55
2b	95,2 ± 0,5	5,3 ± 0,4	10	14	42,1 ± 1,6	30,3 ± 0,4	27	30	57,8 ± 2,2	69,3 ± 0,5	31
3	92,6 ± 0,2	12,7 ± 0,4	33	15	37,5 ± 2,3	31,1 ± 0,4	12	31	52,2 ± 1,7	68,4 ± 0,4	44
3a	92,3 ± 0,4	17,4 ± 0,7	16	16	66,5 ± 0,9	29,9 ± 0,4	40	32	47,9 ± 2,1	73,9 ± 0,3	38
3b	91,8 ± 0,5	9,7 ± 0,5	16	17	59,3 ± 1,3	31,5 ± 0,4	33	33	47,2 ± 2,0	76,3 ± 0,2	52
4	87,8 ± 0,4	19,0 ± 0,4	33	18	57,0 ± 1,6	32,3 ± 0,4	19	34	48,8 ± 1,8	80,0 ± 0,2	69
4a	88,1 ± 0,3	18,1 ± 0,3	16	19	53,6 ± 1,6	32,1 ± 0,5	14	35	47,1 ± 2,1	83,2 ± 0,2	64
4b	87,2 ± 0,6	10,2 ± 0,3	17	20	58,7 ± 1,7	42,1 ± 0,3	32	36	47,3 ± 2,3	86,3 ± 0,2	46
5	82,5 ± 0,5	21,7 ± 0,4	51	21	56,2 ± 1,3	45,2 ± 0,3	59	37	61,8 ± 1,2	100	85
6	78,7 ± 0,4	24,6 ± 0,4	50	22	46,2 ± 3,0	42,3 ± 0,4	13	38	38,9 ± 2,0	100	35
7	73,1 ± 0,6	27,6 ± 0,5	47	23	35,9 ± 3,3	42,7 ± 0,6	10	39	43,0 ± 1,9	132,0 ± 0,3	88
8	77,6 ± 1,4	12,3 ± 0,8	13	24	68,1 ± 1,1	53,4 ± 0,2	68	40	48,5 ± 1,9	8,9 ± 0,2	60
9	69,7 ± 1,0	17,2 ± 0,3	37	25	61,8 ± 1,3	53,8 ± 0,2	57	41	42,6 ± 2,4	13,9 ± 0,6	32
10	65,7 ± 1,1	21,5 ± 0,2	43	26	54,0 ± 1,4	53,1 ± 0,3	47	42	27,3 ± 2,8	17,0 ± 1,0	7

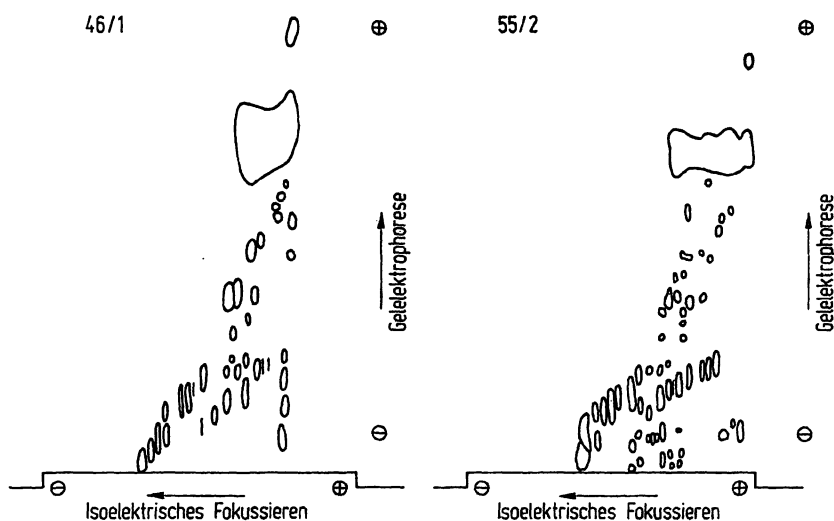


Abb. 1

Zweidimensionale Auftrennung der menschlichen Serumproteine durch isoelektrisches Fokussieren und anschließende Gelelektrophorese. Links: Normalserum. Rechts: Pathologisches Serum (posthepatitische Lebercirrhose) mit zusätzlichen Fraktionen im Immunglobulin-Bereich. Zeichnung nach den Gelen

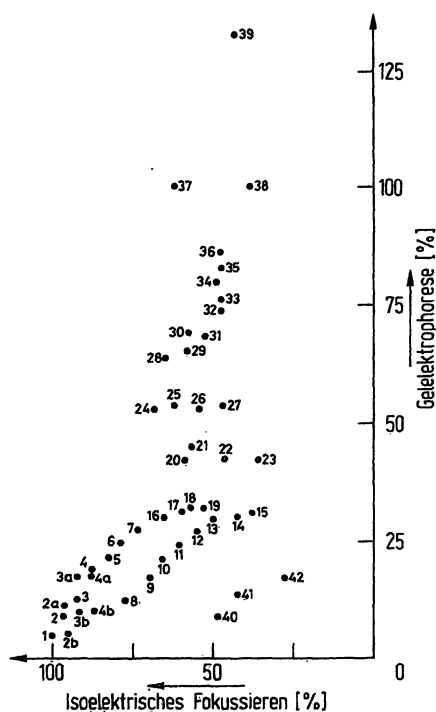


Abb. 2

Diagramm der relativen Wandergeschwindigkeiten von menschlichen Serumproteinen nach zweidimensionaler Auftrennung

Albumins und für die Abszisse die am weitesten wandernde Fraktion Nr. 1 gleich 100 gesetzt und die Strecken der anderen Proteine in Prozent aufgetragen (R-Werte). Bei der Trennung mittels Fokussieren ergeben sich relativ hohe mittlere Fehler der Mittelwerte (vgl. Tab. 1), jedoch entsprechen sich die Muster auch bei Gelen mit stark differierenden Einzelwerten. Mit beiden Kriterien — relative Zuordnung beim Fokussieren und Wanderstrecke bei der sich anschließenden Gelelektrophorese — läßt sich aber eine genaue Identifizierung der Proteine erreichen. Da zwischen männlichen ( $n = 32, 43$  Gele) und weiblichen ( $n = 21, 46$  Gele) Versuchspersonen keine Unterschiede bestehen, wurden beide Gruppen zusammengefaßt. Die Fraktionen 1—19 sowie 40—42 umfassen den Immunglobulin-Bereich; im Gegensatz zu den Befunden von DALE und LATNER (2) ließ sich hier eine bessere Auftrennung erreichen. In diesem Bereich sind sicher noch andere Proteine, wie z. B. das  $\alpha_2$ -Makroglobulin, enthalten. In einigen Fällen waren statt der Flecke 2, 3 oder 4 jeweils zwei Proteine zu finden (2a, 2b usw.). Nach FRIEDRICH und SCHOLTAN (7) lassen sich die Immunglobuline nach Fällung der

übrigen Proteine durch Cetylpyridiniumchlorid (4 g/l) isolieren. Bei entsprechenden Versuchen blieben die Fraktionen 1—7, 16, 17 und eventuell auch 18 gelöst und dürften somit die Immunglobuline darstellen. Eine genauere Untersuchung ist in Arbeit. Fleck 24 wurde mit der Methode von MUELLER et al. (6) als Transferrin bestimmt. Im Gc-Bereich konnten mittels Immundiffusion bis zu drei Fraktionen nachgewiesen werden, wobei die schnelle Fraktion (R-Wert  $82,5 \pm 0,5$ ) dem Typ 1—1, die langsame (R-Wert  $74,7 \pm 0,5$ ) dem Typ 2—2 entspricht. Beiden Typen sowie dem Mischtyp 2—1 gemein ist eine mittelschnelle Fraktion (R-Wert  $78,6 \pm 0,4$ ). Das dem 2—2-Typ entsprechende Protein läßt sich der Fraktion 32, das dem 1—1-Typ entsprechende der Fraktion 35 zuordnen. Der R-Wert des mittleren Proteins stimmt weder mit Fleck 33 noch mit 34 überein, er liegt intermediär. Das Vorhandensein von zwei bzw. drei Banden stimmt mit den Befunden von BEARN et al. (8) und RUOSLAHTI und

TALLBERG (9) überein. KRÜPE und SCHMITT (10) fanden für den Typ 1—1 drei Fraktionen, für 2—2 und 2—1 je vier. Diese Protein-Komponenten wurden jedoch von ihnen nicht direkt mit einem Anti-Gc-Serum geprüft, so daß es fraglich ist, ob alle der als Gc bezeichneten Proteine diesen tatsächlich entsprechen. Die Fraktionen 37 und 38 bestehen im wesentlichen aus Albumin, jedoch werden von ihm weitere Proteine verdeckt (z. B.  $\alpha_1$ -Antitrypsin). Die dargestellte Methode ist für speziellere Untersuchungen pathologischer Seren, insbesondere im Immunglobulin-Bereich, sehr gut geeignet; Voraussetzung ist allerdings eine genaue Identifizierung der einzelnen Fraktionen. Für Routineuntersuchungen sind jedoch die herkömmlichen Methoden aufgrund des geringeren Zeitaufwandes besser geeignet.

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft danke ich für die Unterstützung.

### Literatur

1. MACKO, V. & STEGEMANN, H. (1969), Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 350, 917—919. — 2. DALE, G. & LATNER, A. L. (1969), Clin. Chim. Acta 24, 61—68. — 3. DOMSCHKE, W., SEYDE, W. & DOMAGK, G. F. (1970), diese Z. 8, 319—320. — 4. STEGEMANN, H. (1970), Z. Anal. Chem. 252, 165—169. — 5. KOENIG, R., STEGEMANN, H., FRANCKSEN, H. & PAUL, H. L. (1970), Biochim. Biophys. Acta 207, 184—189. — 6. MUELLER, J. O., SMITHIES, O. & IRWIN, M. R. (1962), Genetics 47, 1385—1392. —
7. FRIEDRICH, H. & SCHOLTAN, W. (1962), Deut. Pat. Nr. 1130113, zit. nach SCHULTZE, H. E. & HEREMANS, J. F. (1966), Molecular Biology of Human Proteins, Bd. 1, 262, Elsevier Publ. Comp., Amsterdam. — 8. BEARN, A. G., KITCHIN, F. D. & BOWMAN, B. H. (1964), J. Exp. Med. 120, 83—91. — 9. RUOSLAHTI, E. & TALLBERG, T. (1966), Ann. Med. Exp. Fenn. 44, 1—5. — 10. KRÜPE, M. & SCHMITT, J. (1969), Z. Immun.-Forsch. Allergie Klin. Immun. 137, 307—313.

Dr. Hans-Georg Scheil  
 Institut für Humangenetik und Anthropologie der Universität  
 4000 Düsseldorf  
 Ulenbergstr. 127—129