

# Die Untersuchung von Körperflüssigkeiten mit geringer Proteinkonzentration mittels einer Kombination von Mikro-Disk-Elektrophorese und Elektroimmundiffusion

Investigations of Body Fluids with Low Protein Content by the Combination of Micro-Disc-Electrophoresis and Electroimmunodiffusion

O. Schmut, H. Katschnig \* und M. Zirm

Univ.-Augenklinik Graz (Vorstand: o. Univ.-Prof. Dr. H. Hofmann)

(Z. Naturforsch. 32 c, 405–408 [1977]; received March 9, 1977)

Aqueous Humour, Tears, Cerebrospinal Fluid, Urine, Protein Determination

Fluids of the human body with low protein content, *i.e.* aqueous humour, tears, cerebrospinal fluid, and urine were analyzed by a combination of micro-disc-electrophoresis and electroimmunodiffusion. By this method both qualitative and quantitative statements about the proteins of these fluids can be established.

Die zweidimensionale Immunelektrophorese nach Laurell<sup>1</sup>, die im Prinzip auf Ressler<sup>2</sup> zurückgeht, wurde von Clarke und Freeman<sup>3</sup> zu einem quantitativen Verfahren ausgebaut. Diese Methode beruht auf der elektrophoretischen Trennung eines Proteingemisches in einem antikörperfreien Agarosegel (1. Dimension) und einer darauffolgenden elektrophoretischen Wanderung der Eiweißstoffe in ein an die erste Dimension angegossenes antikörperhaltiges Agarosegel (2. Dimension). Die in der zweiten Dimension erhaltenen Präzipitate können zum qualitativen und quantitativen Nachweis von Proteinen herangezogen werden.

Die Untersuchung von Körperflüssigkeiten mit niederem Eiweißgehalt besitzt nach dieser Methode jedoch geringe Aussagekraft, da nur wenige Präzipitate zu sehen sind. Dadurch wird es notwendig, die Eiweißstoffe auf höhere Konzentrationen anzureichern. Die üblichen Methoden zur Konzentrierung bringen große Schwierigkeiten bei Flüssigkeiten, die nur in geringer Menge gewonnen werden können, wie zum Beispiel Kammerwasser und Tränen. Die Mikro-Disk-Elektrophorese stellt eine Methode dar, bei der minimale Flüssigkeitsmengen gleichzeitig konzentriert und getrennt werden können. Das Polyacrylamidgel kann somit als erste Dimension angesehen werden, an die dann in gleicher Weise wie bei Clarke und Freeman<sup>3</sup> die zweite Dimension angegossen wird.

In dieser Arbeit soll beschrieben werden, wie eine zweidimensionale Immunelektrophorese mit Körperflüssigkeiten geringen Eiweißgehaltes unter Verwendung eines Polyacrylamidgels als erste Dimension durchgeführt werden kann.

## Material

### Kammerwasser

Die intraokulare Flüssigkeit wurde nach Anästhesie der Hornhaut mit Novesin (0,4%) durch Punktion der Vorderkammer gewonnen. Dabei eröffnete man an der Korneoskleralgrenze die Vorderkammer mit einer Discissionsnadel. Anschließend wurden mit Hilfe einer kurz angeschliffenen Punktionsnadel auf einer Mikroliterspritze jeweils 100 Mikroliter Kammerwasser entnommen. Die Punktionen wurden aus diagnostischen Gründen durchgeführt.

### Tränenflüssigkeit

Tränen wurden mit einer stumpfen 20 Mikroliter Kapillare abgenommen. Dabei schiebt man ohne größeren mechanischen Reiz das Ende des Glasröhrchens im Bereich des temporalen Lidwinkels unter das Oberlid, wodurch die Tränenflüssigkeit direkt an der Tränendrüse entnommen werden kann. Die untersuchten Augen waren allgemein reizfrei.

### Liquor cerebrospinalis

Der Liquor wurde durch Lumbalpunktion, die man zu diagnostischen Zwecken durchführte, gewonnen. Weder Zellzahl noch Eiweißgehalt waren pathologisch.

\* Medizinische Univ.-Klinik Graz (Vorstand: o. Univ.-Prof. Dr. S. Sailer).

Sonderdruckanforderungen an Dr. Otto Schmut, Universitäts-Augenklinik, Auenbruggerplatz 4, A-8036 Graz.



### Harn

Es wurde der Morgenharn von Patienten mit einer Glomerulonephritis mit nephrotischem Einschlag zur Bestimmung herangezogen.

### Serum

Die Serumverdünnungen wurden mit Serum von gesunden Personen hergestellt.

## Methoden

Die Bestimmung des Proteingehaltes der Untersuchungslösungen erfolgte turbidimetrisch nach Meulemans<sup>4</sup>.

Die Mikro-Disk-Elektrophorese wird, wie bei Schmut und Zirm<sup>5</sup> beschrieben, durchgeführt. Dabei werden Sammel- und Trenngel (Gelsystem Nr. 1 a nach Maurer<sup>6</sup>) in Glasröhrchen gegossen, die einen Durchmesser von 0,2 cm und eine Länge von 10 cm besitzen. Pro Röhrchen werden je nach Proteingehalt 50–100  $\mu$ l Untersuchungslösung aufgetragen (80  $\mu$ l Eiweißlösung bei einer Konzentration von 20 mg/100 ml). Nach der Elektrophorese (90 min bei 6 mA pro Röhrchen) friert man die Röhrchen bei  $-20^{\circ}\text{C}$  ein. Die Gele lassen sich daraufhin beim Auftauen leicht herauspressen. Die ungefärbten Polyacrylamidgele werden auf  $7 \times 7$  cm Objektträger, die sich auf einem Horizontaltisch befinden, gelegt. Der Abstand vom unteren Rand beträgt 1,5 cm (Abb. 1). Parallel dazu wird in 2 cm Abstand vom unteren Rand ein Messingblock als Abgrenzung auf den Objektträger gestellt und das Polyacrylamidgel mit 1% Agarose (Barbitalpuffer pH 8,6; Ionenstärke 0,02) umgossen. Den Messingblock entfernt man nach dem Erstarren der Agarose und gießt die auf dem Objektträger freigebliebene Fläche mit antiserumhaltiger Agarose (1% Agarose,

Barbitalpuffer pH 8,6; Ionenstärke 0,02; 1,5 ml Antiserum \*) niveaugleich aus.

Für die Intermediärgeltechnik stanzt man an dieser Stelle einen 1,5 cm breiten Streifen zwischen das antiserumfreie und antiserumhaltige Gel (Abb. 1) und gießt Agarose ein, die ein monospezifisches Antiserum enthält. Wesentlich ist, daß danach alle aneinandergelassenen Gele die gleiche Höhe besitzen. Die Elektrophorese in die zweite Dimension wird in einer Elektrophoresekammer auf einem Wasserkühlblock durchgeführt. Die aufgelegten Filterpapierstreifen tauchen in einen Barbitalpuffer (pH 8,6; Ionenstärke 0,02). Die Elektrophorese (35 mA pro Gelplatte) ist beendet, wenn das Albuminpräzipitat, das gut zu erkennen ist, voll ausgebildet ist (2–3 h).

Danach wird das Polyacrylamidgel entfernt und der Objektträger 24 h in physiol. Kochsalzlösung gelegt. Dann bedeckt man das Gel mit einem 1 mm dicken Filterpapier, legt darauf eine 2 cm dicke Schicht Zellstoff, darüber eine Platte, die mit ungefähr 1 kg beschwert ist und preßt 2 h aus. Daraufhin wird in  $\text{H}_2\text{O}$  dest. ausgewaschen, nochmals ausgepreßt und die Gele mit dem aufgelegten Filterpapier im Brutschrank bei  $50^{\circ}\text{C}$  getrocknet. Von der trockenen Platte wird unter Wasser das Filterpapier entfernt. Die Färbung erfolgt mit Coomassie Brilliant Blue R 250 (0,5% in einer Mischung aus 450 ml Äthanol 96%, 450 ml  $\text{H}_2\text{O}$  und 100 ml Eisessig) in einem Zeitraum von 3 h. Nach dem Entfärben in der oben angegebenen Äthanol/ $\text{H}_2\text{O}$ /Eisessig-Mischung werden die Platten an der Luft getrocknet.

## Ergebnisse und Diskussion

Die in dieser Arbeit untersuchten Körperflüssigkeiten hatten nach der Methode von Meulemans<sup>4</sup> folgende Eiweißkonzentrationen: Kammerwasser 35 mg%, Tränen 18 mg%, Liquor 30 mg%, Harn (1:10) 80 mg% und die Serumverdünnung (1:100) 72 mg%. Nach diesen Proteinkonzentrationen richtete sich das Flüssigkeitsvolumen, das auf die Polyacrylamidgele aufgetragen wurde sowie die Antiserummenge, die zur Agarose zugesetzt wurde. Die Abbildungen zeigen die Ergebnisse der Kombination von Mikro-Disk-Elektrophorese und Immunelektrophorese von Kammerwasser (Abb. 2), Tränen (Abb. 3), Liquor (Abb. 4) und Harn (Abb. 5). Dabei ist eine Vielzahl von Immunpräzipitaten zu erkennen, deren Zuordnung zum entsprechenden Protein durch die sogenannte Intermediärgeltechnik ermöglicht wird.

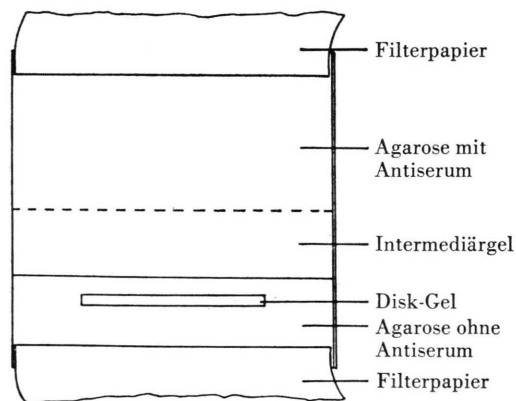


Abb. 1. Schematische Darstellung der Kombination von Mikro-Disk-Elektrophorese und Elektroimmundiffusion.

\* Behringinstitut, Marburg/Lahn, BRD.

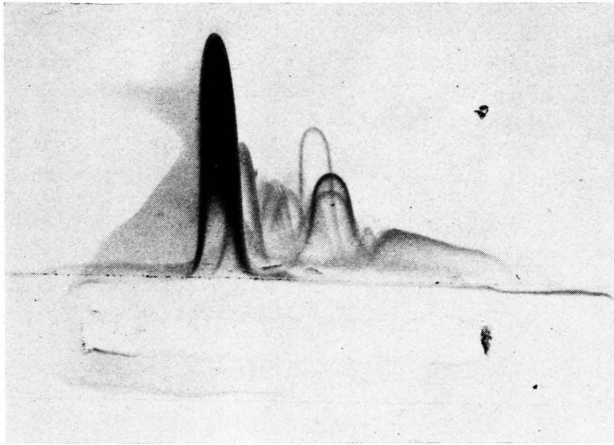


Abb. 2.

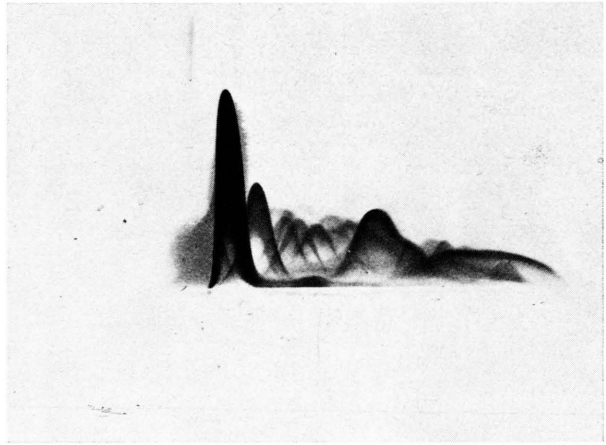


Abb. 4.

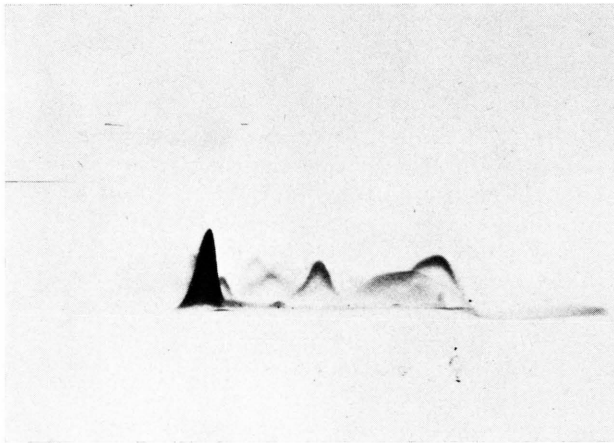


Abb. 3.

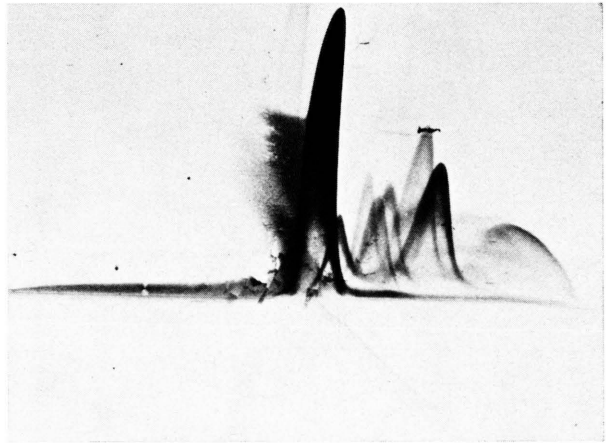


Abb. 5.

Abbn. 2–5. Kombination von Mikro-Disk-Elektrophorese und Elektroimmundiffusion von Kammerwasser (2), Tränen (3), Liquor (4) und Harn (1:10) (5). Im Vergleich mit Abb. 6 a ist zu erkennen, daß in allen untersuchten Flüssigkeiten die Präzipitate der hochmolekularen Protein  $\alpha_2$ -Makroglobulin und  $\beta$ -Lipoprotein fehlen.

Dabei wird im Intermediärgel, das ein monospezifisches Antiserum enthält, das gesuchte Protein zur Präzipitation gebracht. Die übrigen Eiweißstoffe wandern weiter und präzipitieren erst im dahinterliegenden Gel, das das polyvalente Antiserum enthält. Im Vergleich zu einer Gelplatte, in deren Intermediärgel kein Antiserum gelöst ist (Abb. 6 a), kann festgestellt werden, welches Präzipitat zu dem gesuchten Protein gehört. In Abb. 6 b wurde in das Intermediärgel ein Anti-Transferrin-Antiserum gemischt. Das Transferrin präzipitiert daher schon im Intermediärgel, und man kann daraus schließen, welches Präzipitat in Abb. 6 a das Transferrinpräzipitat ist. Als auffälligstes Merkmal ist in den Abbildungen zu sehen, daß die von uns untersuchten

Körperflüssigkeiten im Vergleich zum Serum (Abb. 6 a) kein  $\alpha_2$ -Makroglobulin (MG 820 000) und kein  $\beta$ -Lipoprotein (MG 3 200 000) enthalten. Diese Riesenmoleküle fehlen unter normalen Umständen, können aber bei gewissen pathologischen Prozessen die Filtrationsbarrieren passieren. Die Bestimmung dieser Proteine in den beschriebenen Flüssigkeiten, die klinische Bedeutung besitzt, kann mit dieser Elektrophorese relativ einfach erfolgen.

Neben qualitativen Aussagen kann diese Methode auch zu quantitativen Bestimmungen herangezogen werden. Dabei unterwirft man Antigenlösungen mit bekannter Konzentration der Elektrophorese und erhält Präzipitate, deren Fläche der Konzentration des zu bestimmenden Eiweißstoffes proportional ist.

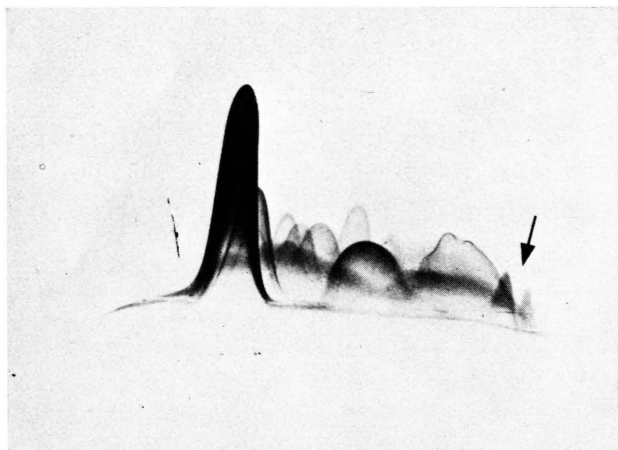


Abb. 6 a. Intermediärgelelektrophorese von Serumverdünnung (1 : 100). Die Präzipitate von  $\alpha_2$ -Makroglobulin und  $\beta$ -Lipoprotein sind deutlich zu erkennen (Pfeil). Das Intermediärgelelelektrophorese enthält kein Antiserum.

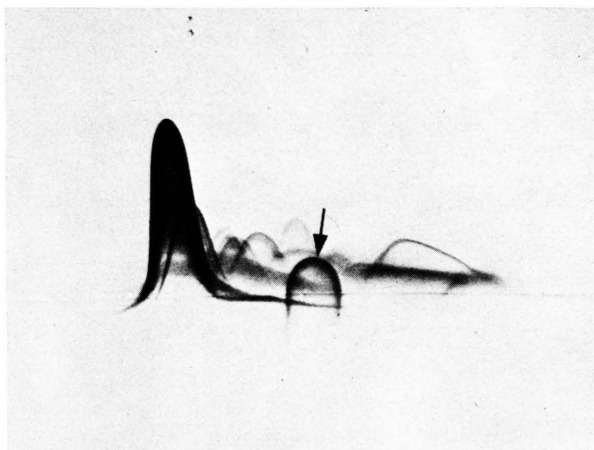


Abb. 6 b. Zum Intermediärgelelelektrophorese war ein Anti-Transferrin-Serum gemischt. Daher begann die Präzipitation des Transferrins bereits im Intermediärgelelelektrophorese (Pfeil). Damit kann man in Abb. 6 a das Transferrinpräzipitat zuordnen.

Anhand einer Eichkurve wird dann die Konzentration des gesuchten Eiweißstoffes ermittelt. Dieses quantitative Verfahren kann sowohl mit monospezifischen als auch mit oligospezifischen Antisera ausgeführt werden, wobei es dann gelingt, gleichzeitig eine Aussage über mehrere Proteine zu machen.

Da man bei der von uns beschriebenen Methode die Menge der untersuchten Flüssigkeit in einem relativ großen Bereich variieren kann und es möglich

ist, größere Volumina aufzutragen, als bei der radialen Immundiffusionsmethode<sup>7</sup>, sind Proteine erfaßbar, die mit Hilfe der radialen Immundiffusion nicht mehr bestimmt werden können.

Diese Methode besitzt somit große Vorteile und man kann mit geringen Mengen einen Überblick über das Proteinspektrum einer Körperflüssigkeit erhalten, die eine minimale Eiweißkonzentration aufweist.

<sup>1</sup> C. B. Laurell, *Analyt. Biochem.* **10**, 358 [1965].

<sup>2</sup> N. Ressler, *Clin. Chim. Acta* **5**, 795 [1960].

<sup>3</sup> M. H. G. Clarke u. T. Freeman, *Clin. Sci.* **35**, 403 [1968].

<sup>4</sup> O. Meulemans, *Clin. Chim. Acta* **5**, 757 [1960].

<sup>5</sup> O. Schmut u. M. Zirm, *Albrecht v. Graefes Arch. Klin. Exp. Ophthalm.* **188**, 217 [1973].

<sup>6</sup> H. R. Maurer, *Disk-Elektrophorese*, W. de Gruyter, Berlin 1968.

<sup>7</sup> G. Mancini, A. O. Carbonara u. J. Heremans, *Immunochemistry* **2**, 235 [1965].