

Z. klin. Chem. u. klin. Biochem.  
8. Jg., S. 27—29, 1970

## Eine Störung durch Elektrolyte bei der Färbung elektrophoretisch aufgetrennter Eiweißkörper mit Amidoschwarz 10B

Von H. WACHTER, W. GÜTTER, A. HAUSEN und G. SALLABERGER

Aus dem Institut für Medizinische Chemie der Universität Innsbruck (Vorstand: Prof. Dr. R. Stöhr)

(Eingegangen am 9. August 1969)

Elektrolyte in minimalen Konzentrationen, wie sie in Methylalkohol purissimum enthalten sein können, verursachen bei der Entfärbung von mit Amidoschwarz 10B angefärbten Serumelektrophoresestreifen durch Herauslösen von Farbstoff eine scheinbare Verschiebung der Relativprozente der Proteinfractionen. Solche falschen Ergebnisse können durch ein einfaches Prüfverfahren vermieden werden. Es wird der Einfluß unterschiedlicher Elektrolyte auf die Entfärbung der einzelnen papierelektrophoretisch aufgetrennten Eiweißbanden untersucht und mit Radiokobalt eine Verdrängung des Amidoschwarz 10B vom Eiweiß durch Elektrolyte gefunden.

### *Interference by electrolytes in the location of proteins with Amidoschwarz 10B on electrophoretograms*

Minimal concentrations of electrolytes, such as may be present in methyl alcohol purissimum, cause an apparent shift in the relative percentages of the protein fractions measured on serum electrophoresis strips with Amidoschwarz 10B; some dye is leached from the protein during the destaining procedure. These false results can be avoided by a simple test procedure. The leaching of the Amidoschwarz 10B from protein by various electrolytes is determined with radio-cobalt during the destaining of single protein bands separated on paper electrophoretograms.

Die Färbung elektrophoretisch aufgetrennter Proteine mit Amidoschwarz 10B nach GRASSMANN und HANNIG (1) erfolgt in zwei Teilschritten. Zuerst wird der gesamte Streifen gleichmäßig angefärbt; farbfreie Bäder dienen beim zweiten Schritt zum möglichst vollständigen Entfernen des nicht an Eiweiß gebundenen Farbstoffes.

Im Verlaufe der letzten Jahre beobachteten wir bei der Durchführung dieses Färbeprozesses im Routinelaboratorium wiederholt Störungen, die nicht durch den Farbstoff bedingt waren. Aus den Eiweißbanden wurden unterschiedliche Farbstoffmengen herausgelöst, wodurch die quantitativen Ergebnisse der Elektrophorese verfälscht wurden. Untersuchungen der verwendeten Reagenzien zeigten, daß die Störungen durch Methylalkohol verursacht wurden. Es handelte sich um vereinzelte Chargen von Methylalkohol purissimum, den wir aus wirtschaftlichen Gründen im Routinebetrieb verwenden.

Ziel dieser Arbeit war, die Ursache dieser Störung aufzufinden. Ein einfaches Prüfverfahren der Lösungsmittelchargen auf Tauglichkeit zur Verwendung für die Entfärbung sollte angegeben werden. Auch schien es interessant, ob Aussagen über den Mechanismus der Störreaktion gemacht werden können.

### Material und Methodik

#### Geräte

**Eiweißfärbung:** Elektropheromat, Fa. Seibold, Wien (2).

**Photometrie:** Quarzspektrophotometer, Modell DU, Beckman, South Pasadena, Calif.

**Elektrophorese und Transparenzphotometrie:** Elphor, Fa. Bender und Hobein, München.

**Schüttelgerät:** Elphor-Wippe, Fa. Bender und Hobein, München.

**Röntgenfluoreszenzanalyse:** Kristalloflex 4 mit Vakuumzusatz, Fa. Siemens, Karlsruhe.

**Messung der Radioaktivität:** Geiger-Müller-Zählstand FH 49, Fa. Frieseke und Hoepfner, Erlangen/Bruck.

#### Reagenzien

Amidoschwarz 10B, Merck; Eisessig p. a., Merck; Methanol p. a., Merck; Methylalkohol purissimum, Heilmittelwerke, Wien.

#### Methoden

Elektrophorese nach GRASSMANN und HANNIG (1), Trocknung der Streifen mit Ventilator, Eiweißfärbung (2) mit Amidoschwarz 10B in Methylalkohol/Eisessig 9:1 (v/v), Entfärbelösung Methylalkohol/Eisessig 9:1 (v/v).

### Experimentelles

Eine Charge Methylalkohol purissimum, die die bereits erwähnte Störung zeigte, wurde fraktioniert destilliert. Die störenden Bestandteile befanden sich im Destillationsrückstand. Die Röntgenfluoreszenzanalyse des Rückstandes ergab als Hauptbestandteil Zinksulfat in etwa 0,002 Gew.% bezogen auf Methylalkohol. Daneben waren noch Spuren freier Schwefelsäure und Wasser enthalten.

Zur Überprüfung der Lösungsmittel auf ihre Verwendbarkeit zur Entfärbung fanden wir folgendes einfaches Verfahren (Abb. 1): Ein mit Amidoschwarz 10B unter Verwendung von p. a. Lösungsmitteln gefärbter und entfärbter Elektrophoresestreifen wird mit 100 ml Entfärbelösung, die das zu prüfende Lösungsmittel als Bestandteil enthält, auf der Wippe 10 Min. geschüttelt.



Abb. 1

#### Prüfverfahren für Entfärbelösung

Ein mit p. a. Reagenzien gefärbter und entfärbter Elektrophoresestreifen wird der Länge nach durchgeschnitten. Eine Hälfte des Streifens (B) dient als Vergleichstreifen, die andere Hälfte (A) wird 10 Min. in 100 ml der zu prüfenden Entfärbelösung gewippt. Der Streifen A wurde in diesem Falle deutlich entfärbt. Das Methanol war mit 0,002 Gew.% Zinksulfat verunreinigt. Läge keine Verunreinigung vor, so würde der Streifen A auch nach dieser Behandlung dem Streifen B in seiner Farbintensität vollkommen gleichen.

Nicht einwandfreie Reagenzien bewirken durch weiteres Herauslösen von Farbstoff aus den Eiweißbanden eine Blaufärbung der Entfärbelösung, die durch Photometrie (595 nm) quantitativ verfolgt werden kann. Einwandfreie Reagenzien bleiben völlig farblos. Ein derart überprüfetes Lösungsmittel entspricht in seiner Tauglichkeit zur Verwendung in Entfärbebädern einem p. a. Präparat.

Mit dieser Methode wurde der Einfluß unterschiedlicher Elektrolyte auf den Entfärbvorgang quantitativ untersucht. Mit dem gleichen Serum beladene Streifen wurden nach elektrophoretischer Auftrennung mit Amidoschwarz 10B in Methylalkohol p. a./Eisessig p. a. 9:1 (v/v) gefärbt und entfärbt. Die gefärbten Streifen schüttelten wir 10 Min. in einem Bad mit 50 ml/Entfärbelösung (p. a. Präparate) unter Zusatz von 6,2  $\mu$ Mol unterschiedlicher Elektrolyte. Photometrieren der schwach blau gefärbten Lösung ergab die von den eingesetzten Elektrolyten herausgelösten Mengen Amidoschwarz 10B (Tab. 1).

Tab. 1

Menge von Amidoschwarz 10B, die durch Zusatz von 6,2  $\mu$ Mol Elektrolyt zu 50 ml/Entfärbelösung aus gefärbten Elektrophoresestreifen herausgelöst wurde

Elektrolyt	Amidoschwarz 10B in mg
NH <sub>4</sub> Cl	0,018
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	0,017
NH <sub>4</sub> J	0,016
ZnCl <sub>2</sub>	0,018
Zn(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	0,017
Na <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	0,005
NaBr	0,004
NaNO <sub>3</sub>	0,003
NaF	0,003
NaCl	0,001
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0,043
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0,039
Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0,033
CoSO <sub>4</sub>	0,031
MgSO <sub>4</sub>	0,029
ZnSO <sub>4</sub>	0,029
K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0,026
CdSO <sub>4</sub>	0,024
FeSO <sub>4</sub>	0,020
CuSO <sub>4</sub>	0,018
CaSO <sub>4</sub>	0,007
MnSO <sub>4</sub>	0,006

Zur Untersuchung, ob bei dem Entfärbvorgang Ionen an Protein gebunden werden, erschienen in Anbetracht der geringen Substanzmengen nur radiochemische Methoden erfolgversprechend. Ein mit Serumprotein beladener, gefärbter Elektrophoresestreifen

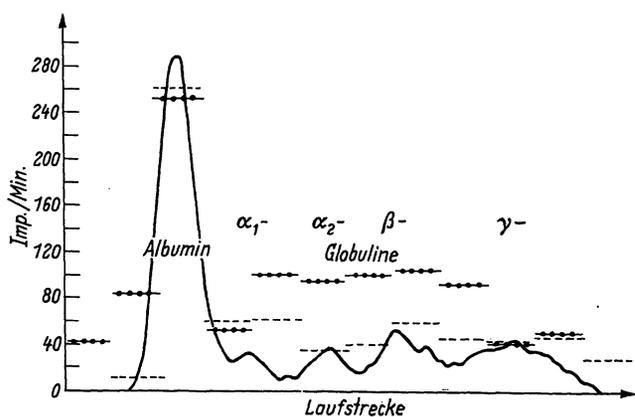


Abb. 2

Radioaktivität eines mit <sup>60</sup>CoSO<sub>4</sub> behandelten gefärbten (---) und eines ungefärbten (- - -) nur mit Protein beladenen Elektrophoresestreifens und Elektropherogramm (—) derselben Streifen. Das eingesetzte Kobaltsulfat hatte eine Radioaktivität von 138000 Imp./Min. (---) bzw. 224500 Imp./Min. (- - -)

Tab. 2

Einwirkung der Färbelösung (a) bzw. der Entfärbelösung (b) auf die Radioaktivität eines angefärbten mit <sup>60</sup>CoSO<sub>4</sub> beladenen Elektrophoresestreifens

	Ausgangswert	Einwirkung 10 Min.	Einwirkung 30 Min.
a)	730 Imp./Min.	95 Imp./Min.	5 Imp./Min.
b)	704 Imp./Min.	187 Imp./Min.	50 Imp./Min.

Tab. 3

Einwirkung von Elektrolytzusatz auf die quantitative Auswertung (rel.-%) von Serumweißelektrophoresen

Elektrolyt	Albumin	$\alpha_1$	$\alpha_2$	$\beta$ - Globulin	$\gamma$
ohne Zusatz	56,6	5,2	7,6	14,1	16,5
Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	59,8	4,7	6,9	13,4	15,2
ZnSO <sub>4</sub>	62,8	5,0	6,5	10,9	14,8
CoSO <sub>4</sub>	65,7	3,4	4,8	10,9	15,2
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	62,9	4,6	8,0	10,4	14,1

wurde mit jeweils 50 ml/ Methylalkohol p. a./Eisessig p. a. (9:1) (v/v) unter Zusatz von trägerfreiem <sup>60</sup>CoSO<sub>4</sub> 10 Min. geschüttelt. Der Streifen wurde nach dem Trocknen in 1 cm breite Stücke zerschnitten und deren Radioaktivität mit dem Geigerzähler gemessen. In der gleichen Weise behandelten wir auch einen mit Serumprotein beladenen, nicht gefärbten Streifen. Mittelwerte aus 3—5 Messungen sind in der Abbildung 2 zusammen mit der Transparenzphotometrischen Auswertung des gefärbten Streifens gezeigt. Die beiden Versuche ergaben eine deutliche Steigerung der Radioaktivität an den Positionen der Proteinfractionen.

Geringe Elektrolytmengen im Farbbad stören die Anfärbung nicht. Serumelektrophoresestreifen, die durch Entfärbelösungen mit Elektrolytzusatz entfärbt wurden, ergeben nach neuerlicher Anfärbung mit elektrolytfreien Lösungsmitteln bei quantitativer Auswertung korrekte Ergebnisse (3). Diese Beobachtungen können befriedigend durch die Annahme einer gegenseitigen Verdrängung von Farbstoff und Elektrolyt erklärt werden. Den Nachweis dieser Annahme erbrachten Experimente mit bereits angefärbten und mit <sup>60</sup>Co<sup>++</sup> beladenen Streifen. Nochmaliges Einfärben der Streifen führte zu einem vollständigen Verlust der Radioaktivität, auch an den Stellen der Proteinbanden. Im Gegensatz dazu zeigten gleich angefärbte, mit <sup>60</sup>Co<sup>++</sup> markierte Serumelektrophoresestreifen nach Digerieren mit den gleichen Lösungsmitteln ohne Farbzusatz einen deutlichen Erhalt der Aktivität (Tab. 2).

In einer weiteren experimentellen Reihe sollte untersucht werden, ob der prozentuale Farbverlust bei Elektrolytzusatz für die einzelnen Proteinfractionen variiert und ob für unterschiedliche Kationen Differenzen bestehen. Mit Amidoschwarz 10B gefärbte Elektrophoresestreifen des gleichen Serums wurden mit 50 ml/ Methylalkohol p. a./Eisessig p. a. (9:1) (v/v) unter Zusatz von jeweils 6,2  $\mu$ Mol Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, ZnSO<sub>4</sub>, CoSO<sub>4</sub> und (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 10 Min. geschüttelt. Die Relativprozente der Transparenzphotometrischen Auswertung dieser Streifen (Mittelwerte von jeweils 2 Bestimmungen) sind in Tabelle 3 angeführt.

## Ergebnisse und Diskussion

Eine Störung der Eiweißfärbung mit Amidoschwarz 10B wurde auf den zweiten Teilschritt, die Entfärbung in farbstofffreien Bädern, lokalisiert. Die Ursache bestand in einer Verunreinigung des Methylalkohols mit Spuren von Zinksulfat. Wir haben ein einfaches Verfahren angegeben, mit dem jede Charge des Lösungsmittels geprüft werden kann, ob sie zur Entfärbung tauglich ist; mit dieser Methode wurde die Störung bei Zusatz von Elektrolyten quantitativ untersucht. Aus Tabelle 1 ist ersichtlich, daß alle in höherem Maße wirksamen Verbindungen Sulfate sind. Der Effekt ist jedoch nicht nur aufgrund der Wirkung des Sulfats zu erklären. Vergleicht

man die Sulfate folgender Kationen, erhält man die Reihung  $H^+ > NH_4^+ > Na^+ > Co^{++} > Mg^{++} = Zn^{++} > K^+ > Cd^{++} > Fe^{++} > Cu^{++} > Ca^{++} > Mn^{++}$ , die weitgehend parallel mit der Bindungsfähigkeit der Serumproteine für diese Kationen verläuft (5, 6).

Unsere Experimente mit radioaktiv markiertem Kobalt haben gezeigt, daß die Radioaktivität an den einzelnen Eiweißfraktionen Maxima aufweist; durch Nachfärben mit Amidoschwarz 10B geht die Radioaktivität wieder verloren. Daraus schließen wir, daß Farbstoff und Elektrolyte einander verdrängen.

Aufgrund der für ein Ion unterschiedlichen Bindungstendenz zu den Serumproteinen erfolgt bei der Verdrängung des Farbstoffes durch Elektrolyte eine Verschiebung der Relativprozent der Proteinfraktionen, obwohl die Serumproteine nicht quantitativ verändert werden. Quantitative Untersuchungen unter Zusatz einiger Sulfate zur Entfärbelösung ergeben, verglichen mit dem Ausgangswert, deutliche Verschiebungen des Farbgehaltes der Proteinbanden. Da die prozentual stärkste Entfärbung bei den Globulinen erfolgt, resultiert eine scheinbare Zunahme der Albuminfraktion.

Im Blut wird Kobalt vorwiegend an Albumin, aber auch an  $\alpha_2$ -,  $\beta$ - und  $\gamma$ -Globuline (5), Zink an alle Serum-

proteine gebunden (6, 7). Eine praktisch quantitative Bindung einer Komponente an eine Proteinfraktion und dadurch ausschließliche Entfärbung nur einer Eiweißbande, haben wir nicht beobachtet, wohl aber teilweise eine stärkere Entfärbung der Proteinfraktionen, die für den eingesetzten Elektrolyt als Transportvehikel dienen. Quantitative Übereinstimmung unserer Ergebnisse mit Experimenten, bei denen Elektrolytzusatz zum nativen Serum erfolgt, würde überraschen, da in unserem Falle die Proteine durch die Behandlung mit Methylalkohol/Eisessig schon weitgehend denaturiert sind. Durch Denaturierung gleicht sich die Bindungsfähigkeit der Proteinfraktionen weitgehend aus (8). Elektrolytzusatz zum Serum beeinflusst den Anfärbeprozess auf andere Weise und wird im Rahmen einer späteren Arbeit behandelt werden.

Herrn Doz. Dr. E. SCHNELL, Institut für anorganische Chemie der Universität Innsbruck (Vorstand Prof. Dr. E. HAYEK) danken wir für die Durchführung der röntgenfluoreszenzanalytischen Messungen.

Frau Prof. Dr. Dr. h. c. E. CREMER, Vorstand des physikalisch-chemischen Institutes der Universität Innsbruck, danken wir für die Ermöglichung der Durchführung der radiochemischen Messungen.

#### Literatur

1. GRASSMANN, W. und K. HANNIG, Hoppe Seyler's Z. physiol. Chem. 290, 1 (1952). — 2. WACHTER, H., Ärtzl. Laborat. 13, 211 (1967). — 3. WACHTER, H., Ärtzl. Laborat. 10, 335 (1964). — 4. DITTMER, A., Plasmaeiweiß und Elektrophorese, S. 107, 3. Aufl., VEB Gustav Fischer Verlag Jena (1961). — 5. HORST, W., Klin.

Wschr., 37, 961 (1959). — 6. BENNHOLD, H., in P. DESGREZ und P. M. DE TRAVERSE, Transport Function of Plasma Proteins, Elsevier Publishing Company/Amsterdam-London-New York (1966). — 7. BENNHOLD, H., Klin. Wschr. 41, 109 (1963). — 8. PLÜCKTHUN, H. und H. GÖTTIG, Klin. Wschr. 29, 414 (1951).

Univ.-Doz. Dr. H. Wachter  
Institut für Medizinische Chemie  
der Universität Innsbruck  
Müllerstraße 44  
A-6020 Innsbruck