

Z. klin. Chem. u. klin. Biochem.
9. Jg., S. 31—32, Januar 1971

Zur Methode der Elektrophorese von 10 mg Lebergewebe auf Celluloseacetatfolie

Von D. WINTERHOFF und B. DREWITZ

Aus dem Hygiene-Institut der Universität Münster (Direktor: Prof. Dr. H. Reploh)

(Eingegangen am 15. September 1970)

Bei Verwendung einer Celluloseacetatfolie kann man aus einer 10 mg-Leberportion, etwa einer Blindbiopsieprobe von 1 cm Länge, eine klare elektrophoretische Darstellung von Leberproteinen erhalten. Wesentlich ist, Blut- und Serumreste zunächst gründlich zu entfernen. Dann konnten 17 Fraktionen dargestellt werden. Die Ergebnisse waren leicht und sicher reproduzierbar.

The electrophoresis of 10 mg liver tissue on cellulose acetate strips

The use of a cellulose acetate strip permits a clear electrophoretic separation of liver proteins from sample of 10 mg liver, corresponding to a needle-biopsy probe, 1 cm long. Blood and serum must first be thoroughly removed. 17 fractions can be separated and the results can be easily and dependably reproduced.

Veränderungen von Funktion und Struktur der Leberzelle bei Lebererkrankungen werden in der biochemischen Untersuchung und in der Beurteilung des pathologisch-histologischen Präparates meßbar. Eine Ergänzung dieser Methoden, die elektrophoretische Darstellung von Leberproteinen, wurde von verschiedenen Autoren an größeren Gewebeproben von Tieren, seltener auch an menschlichen Leberpunktaten, versucht (1—5).

Ziel der meisten Untersucher war es, aus einer kleinen Gewebeprobe, z. B. einem bei Punktion gewonnenen Stanzzylinder, eine Aussage über das Spektrum der Leberproteine zu machen. Die Schwierigkeiten lagen in der Befreiung der Probe von Blut- und Serumresten und in der meßbaren Auftrennung der geringen Proteinmenge durch Auswahl eines geeigneten Trägermaterials.

Durch Verwendung von Celluloseacetatfolie kann man in der nachfolgend geschilderten Weise zu Standardtrennbedingungen kommen. Die Versuche wurden an 10 mg Proben von frischer Rattenleber durchgeführt. Diese Menge entspricht etwa einem 10 mm langen Gewebszylinder von 1,5 mm Durchmesser.

Material und Methoden

Gewinnung des Lebermaterials

Töten der Wistar-Ratten in Äthernarkose durch Kehlschnitt, Entnahme der Leber, Zerschneiden in Würfel von etwa 2 mm Kantenlänge, Einschlagen der Würfel in Perlongaze (Strumpf) und Auswaschen von Blutbestandteilen für 2 Stdn. unter fließendem Leitungswasser. Aufbewahrung der entbluteten Leberpartikel in Portionen von 10 mg bei -20° . Manuelle Homogenisation einer Portion in einem kleinen Reagenzglas ($\varnothing = 14$ mm, Länge = 65 mm) mit einem Glasstab, dessen abgeschmolzene Seite mit Glaspapier angetaut worden war. Aufnahme des Homogenats in $40 \mu\text{l}$ dest. Wasser zur osmotischen Zerstörung der Zellen. Inkubation 2 Stdn. bei 37° .

Elektrophorese

Shandon¹⁾ — Elektrophoresekammer Typ II nach KOHN, Netzgerät Shandon¹⁾ — Vokam SAE 2761, Cellogel²⁾ — Cellulose-Acetat-Folie ($2,5 \times 14,0$ cm²), LAURELL-Puffer (Natriumdiäthylbarbiturat 23,7 g, Barbitol 2,14 g, dest. Wasser ad 2 l), $U = 220$ V, $I = 1$ mA/cm Streifenbreite.

Auftragen von $3 \mu\text{l}$ des Homogenats mit einer Mikroliterspritze in 5 cm Abstand von der Brücke. Systemkontrolle durch bromphenolblaugefärbtes Humanserum; beenden der Laufzeit nach 100 Min., entsprechend 4,5 cm Laufstrecke des Humanserums, Fixieren und Färben direkt danach in gesättigter Amidoschwarz 10B-Lösung, gelöst in Methanol/Eisessig 9:1 (v/v); Färbezeit 60 Min. Entfärben über mehrere Bäder des Lösungsmittels bis zum Klarbleiben des letzten Bades, Transparenzbad (2 Min. Einwirkungs-dauer): Methanol/Eisessig 8,5:1,5 (v/v). Danach Anrollen des Streifens mit einem Reagenzglas auf einen Objektträger und Trocknen für 10 Min. bei 60° . Photometrische Darstellung des transparenten Streifens im automatischen Auswertegerät für Elektrophoresen der Fa. Gelscan³⁾.

Ergebnisse

Ein mit der oben beschriebenen Methode erzieltes Elektropherogramm zeigt die Abbildung 1. Die Auftragstelle tritt besonders deutlich hervor durch „liegengebliebene“ Proteine. Allen anderen Fraktionen weit voraus sind drei scharf begrenzte, jedoch sehr schwache Banden (Pfeile). Im Mittelfeld zeigt sich eine große Zahl gleichmäßiger, gut voneinandertrennter Fraktionen. Auf dem Originalfolienstreifen lassen sich 17 Fraktionen erkennen. Diesen entspricht auf der Extinktionskurve jeweils ein Maximum oder auch nur eine geringe Steigungsänderung der Kurve. Das dargestellte Elektropherogramm mit seiner Extinktionskurve läßt sich aus verschiedenen Proben derselben Leber nahezu identisch reproduzieren. Wesentlich ist peinliche Kon-

¹⁾ Shandon Scientific Company, Frankfurt/Main.

²⁾ Vertrieb f. Deutschland = Fa. Serva, Heidelberg.

³⁾ Vertreten in Deutschland durch die Fa. Camag, Berlin.

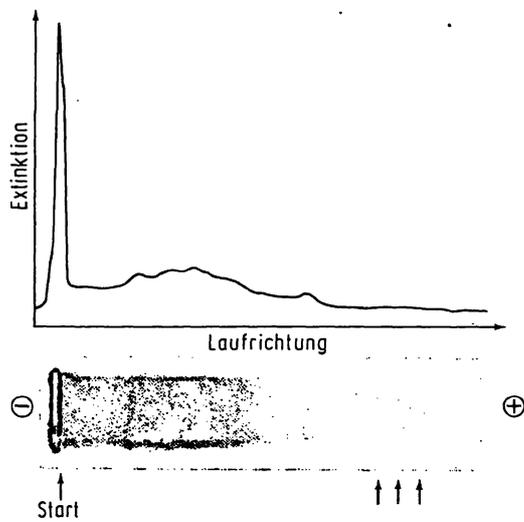


Abb. 1
Elektropherogramm einer 10 mg-Leberprobe mit zugehöriger Extinktionskurve (vgl. auch Text)

stanz in der Aufbereitung (Homogenisation, Inkubation, Auftragen) des Lebermaterials. Der Vergleich entsprechender Untersuchungen an verschiedenen Rattenlebern zeigte, daß von Tier zu Tier geringe Differenzen auftreten können. Dies drückt sich nicht in der Anzahl der darstellbaren Fraktionen, sondern in ihrer Intensität aus.

Literatur

1. FRITZ, W., Arch. Geschwulstforsch. 26, 69 (1965). — 2. KÜCHMEISTER, H. und K. D. VOIGT, Verh. Dtsch. Ges. inn. Med. 59, 492 (1953). — 3. LICHT, W., Zschr. klin. Med. 158, 183 (1964). — 4. WIEME, R. I., Behringwerke Mitt., Marburg 34, 27 (1958). — 5. WIEME, R. I., Agar Gel Elektrophoresis, Elsevier Publishing Company, Amsterdam (1965).

Dr. D. Winterhoff
44 Münster/Westf.
Westring 10