

DETEKTION VON CARBOANHYDRASE ISOENZYMEN IN ACRYLAMIDGELEN MIT EINEM FLUORESZIERENDEN SULFONAMID

Monika HOLKE und P. SIEGMUND

Zentralinstitut für Biochemie und Biophysik der Freien Universität Berlin, 1 Berlin 33, Germany

Received 17 June 1971

DNSA (1-Dimethylamino-naphthalene-5-sulfonamide) forms with carbonic anhydrase (carbonate hydrolase, EC 4.2.1.1) a highly fluorescent complex [1]. We used the formation of these complexes for the detection of the isoenzyme bands of carbonic anhydrase in isoelectric focusing and electrophoresis in acrylamide gels. DNSA is added to the solution of the isoenzymes before separation. Using quartz tubes – the maximum of the excitation spectrum is 280 nm [1] – for supporting the gels the fluorescent enzyme bands can be observed during development in UV light and without putting the gels out of the quartz tubes. This technique allows the detection of the carbonic anhydrase isoenzymes with greater precision and simplicity than with any staining method.

1. Einführung

DNSA* bildet mit Carboanhydrase (Carbonat hydro-lyase, EC 4.2.1.1) einen intensiv fluoreszierenden Komplex [1]. Wir benutzten die Bildung dieser Komplexe zur Detektion der Isoenzyme von Carboanhydrase bei der Elektrofokussierung und der Disc-Elektrophorese in Acrylamidgelen (Abb. 1). DNSA wird der Enzymlösung vor der Trennung der Isoenzyme zugesetzt. Werden für die Herstellung der Gele Quarzröhrchen benutzt – das Maximum des Excitationsspektrums liegt bei 280 nm – so können die Enzymbanden während der Entstehung im UV-Licht beobachtet werden. Auch die abschliessende Betrachtung erfolgt, ohne dass zuvor eine Entnahme der Gele aus den Röhrchen erforderlich wäre. Diese Methode erlaubt eine genauere und einfachere Detektion von Carboanhydrase-Isoenzymen als die üblichen Anfärbemethoden.

2. Reagenzien und Methoden

Acrylamid, N,N'-Methylen-bisacrylamid, Ammoniumpersulfat, N,N,N',N'-Tetramethyläthylen-diamin

* Abkürzung: DNSA = 1-Dimethylamino-naphthalin-5-sulfonamid.

und 1-Dimethylamino-naphthalin-5-sulfochlorid waren analysenreine Präparate der Firma Serva (Heidelberg), Ampholin (40%-ig, pH-Bereiche 3–10, bzw. 5–8) kauften wir von LKB (Bromma, Schweden), Ethoxolamid (6-Äthoxy-benzothiazol-2-sulfonamid; die Stammlösung wurde hergestellt, indem 24 mg Ethoxolamid in 100 ml H₂O suspendiert wurden und tropfenweise bis zur völligen Auflösung conc. NH₃ zugegeben wurde) war ein Geschenk der Fa. Upjohn.

DNSA wurde nach [2] durch Zusammengeben einer klaren Lösung von 250 mg 1-Dimethylamino-naphthalin-5-sulfochlorid in 2,5 ml Aceton mit 1 ml 33%-iger Ammoniaklösung hergestellt. Das Sulfonamid scheidet sich dabei ab. Es wurde aus Äthylalkohol umkristallisiert (F = 215°) (Stammlösung: 0.25% in Äthanol). Die anderen Reagenzien waren analysenreine Handelspräparate.

Herstellung der Carbonhydraselösungen: Heparinisiertes Blut wurde zentrifugiert, die Erythrocyten zweimal mit 0,9%-iger NaCl-Lösung an der Zentrifuge gewaschen und nach Tsuchihashi [3] mit 24% Wasser, 16% Äthanol und 20% Chloroform ihres Volumens vermischt. Die Mischung wurde zentrifugiert und der wässrige Überstand ohne weitere Behandlung für die Trennungen benutzt.

Elektrofokussierung in Acrylamid-Gelen: (modifiziert nach Wrigley [4]). Silikonisierte Quarzröhrchen (7,5 × 0,7 cm) wurden an einer Seite mit Parafilm

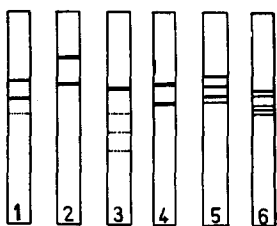


Abb. 1. Im UV-Licht fluoreszierende Banden von DNSA-Carboanhydrase-Komplexen nach Disc-Elektrophorese bzw. Elektrofokussierung in Acrylamidgelen. Die Carboanhydraselösungen wurden durch Chloroform-Äthanol-fällung aus Erythrocyten erhalten. Gele Nr. 1–3 Disc-Elektrophorese (pH 8,9/7% Acrylamid), Gele Nr. 4–6 Elektrofokussierung, Gele Nr. 4 und 5 Ampholin vom pH-Bereich 3–10, Gel Nr. 6 pH-Bereich 5–8. Gele Nr. 1 und 4 Human-, Nr. 2 und 5 Kaninchen-, Nr. 3 und 6 Hühnererythrocyten-Carboanhydrase.

verschlossen und luftblasenfrei mit je 1,5 ml einer Lösung gefüllt, die unmittelbar vor Gebrauch durch Mischen von 1 Volumen einer Acrylamid-Ampholin-Lösung (22% Acrylamid, 0,6% *N,N'*-Methylenbisacrylamid, 0,19% *N,N,N',N'*-Tetramethyläthylen-diamin, 4% Ampholin des entsprechenden pH-Bereiches) mit 3 Volumen einer 0,1%-igen Ammoniumpersulfatlösung erhalten worden war. Die Röhrchen wurden zur Polymerisation eine halbe Stunde bei Zimmertemperatur stehen gelassen.

Die Elektrofokussierung erfolgte in dem analytischen Säulenelektrophoresegerät (Fa. Shandon) in der Kältekammer (+2°). Als Kathodenflüssigkeit (oberes Elektrodengefäß) wurde 0,4%-ige Äthylen-diamin-lösung, als Anodenflüssigkeit (unteres Elektrodengefäß) 0,2%-ige Schwefelsäure benutzt. Um einen Kontakt des Enzymes mit unzersetztem Persulfat zu vermeiden, wurde vor Aufgabe der Proben während 30 min eine Gleichspannung angelegt und nachreguliert, die pro Röhrchen eine Stromstärke von 0,5 mA erzeugte. Dann wurden mit einer Tuberkulinspritze (mit ca. 10 cm langer Kanüle) je 0,2 ml der Enzym-lösung, die auch 10% Saccharose, 1 mM DNSA und gegebenenfalls 1% Ampholin enthält, unmittelbar auf das Gel geschichtet. Die Gleichspannung wurde erneut angelegt und allmählich bis 350 V gesteigert, wobei die Stromstärke pro Röhrchen 0,5 mA nicht überschritt. Die erforderliche Laufzeit zur Ausbildung der Banden betrug etwa 3 Stunden nach Erreichen der Maximalspannung.

Disc-Elektrophorese: Diese wurde nach [5, 6] im Gelsystem pH 8,9/7,0% durchgeführt. Die Gele wurden ebenfalls in silikonisierten Quarzröhrchen (7,5 × 0,7 cm) hergestellt. Die mit Parafilm verschlossenen Röhrchen wurden luftblasenfrei mit je 1,5 ml einer frisch bereiteten Mischung aus einem Volumen einer Lösung, die 0,75 M Tris, 0,12 N HCl 14% Acrylamid, 0,37% *N,N'*-Methylenbisacrylamid und 0,058% *N,N,N',N'*-Tetramethyläthylen-diamin enthielt und einem Volumen einer 0,14%-igen Ammoniumpersulfatlösung gefüllt. Die Röhrchen wurden 30 min bei Zimmertemperatur zur Polymerisation stehen gelassen. 0,2 ml Enzym-lösung, die 1 mM DNSA, 10% Saccharose, 31 mM Tris und 30 mM HCl (pH 6,7) enthielt, wurde über die Gele geschichtet. Die Elektrophorese erfolgte im analytischen Säulenelektrophoresegerät der Fa. Shandon (London) im Kälteraum (+2°). Als Elektrodenpuffer diente eine Lösung, die 38 mM Glycin und 5 mM Tris enthielt. Die obere Elektrode wurde als Kathode gepolt.

3. Ergebnisse und Diskussion

Bisher beschriebene Fluoreszenzmethoden zur Detektion von Proteinbanden in Gelen benutzten entweder die Fluoreszenz der Tryptophanreste, deren kurzweiliges Fluoreszenzsignal jedoch nicht sichtbar sondern nur messbar ist [7], oder die Löschung der Fluoreszenz eines in das Gel einpolymerisierten Indikators. Bei einer anderen Technik wurden [9] modifizierte Proteine mit 1-Dimethyl-aminonaphthalin-5-sulfo-chlorid umgesetzt und nach Dialyse der Proben die jetzt im UV-Licht fluoreszierenden Proteine der Elektrophorese unterworfen. Diese Methoden dienen der unspezifischen Proteindetektion. Die jetzt beschriebene Verwendung des Carboanhydrase-Inhibitors 1-Dimethylaminonaphthalin-5-sulfonamid ermöglicht dagegen eine spezifische Enzym-Detektion durch Fluoreszenz. Wegen der Langweiligkeit der emittierten Strahlung können die Banden bei Verwendung von Quarzröhrchen unmittelbar auch bei ihrer Bildung beobachtet werden, ohne dass die Gele zuvor aus den Röhrchen genommen werden müssten. Einige typische Ergebnisse sind in der Abbildung dargestellt.

Da die Dissoziationskonstanten der DNSA-Carboanhydrase-Komplexe in der Größenordnung 0,1 μ M

liegen, sind bereits bei einer Konzentration von 10 μ M DNSA im Trenngel die Enzymproteine nahezu vollständig als fluoreszierende Komplexe vorhanden. Da die Fluoreszenz des freien DNSA sehr viel geringer als die seines Enzymkomplexes ist, wird sie meistens überhaupt nicht beobachtet. Nur bei Proben mit geringem Carboanhydrase-Gehalt bildet sich bei der Elektrofokussierung eine gelb fluoreszierende Zone, die vermutlich durch beim isoelektrischen Punkt auskristallisiertes DNSA verursacht wird. Diese Fluoreszenz ist aber mit der bläulichen des DNSA–Carboanhydrase-Komplexes nicht zu verwechseln.

Nach [1] wird DNSA auch von Serum-Albumin zu einem fluoreszierenden Komplex gebunden. Diese Reaktion ist jedoch verhältnismässig unempfindlich und die grünliche Fluoreszenz ist deutlich von der bläulichen des DNSA–Carboanhydrase-Komplexes zu unterscheiden. Bei Verwendung gewaschener Erythrocyten als Ausgangsmaterial für die Enzymlösung treten überdies keine störenden Albuminbanden auf. Bei der Inkubation der aus den Röhrchen entnommenen Gele in einer 1 mM Lösung des Carboanhydraseinhibitors Ethoxolamid verschwindet überdies nur die Fluoreszenz der Carboanhydrase-Banden, da Ethoxolamid etwa tausendmal stabilere Komplexe mit Carboanhydrase bildet.

Wir haben die Leistungsfähigkeit der hier beschriebenen Methode mit anderen Verfahren zur Detektion von Carboanhydrasen verglichen, und zwar mit der Esteraseanfärbung nach [10] bei der die Esteraseaktivität von Carboanhydrase zur Spaltung von α -Naphthylacetat benutzt wird und das entstandene α -Naphthol mit einem Diazoniumsalz gekoppelt wird, und zum anderen mit einer histochemischen Methode [11] in einer für die Elektrophorese angegebenen Modifikation [12]. Diese beruht auf der Ausfällung von Cobaltcarbonat in den Carboanhydrasezonen, das anschliessend in Cobaltsulfid überführt wird. Bei beiden Methoden müssen die Gele nach erfolgter Trennung aus den Röhrchen entnommen werden und beide Tests erfordern einen bestimmten pH-Bereich, was ihre Verwendbarkeit bei der Elektrofokussierung erheblich einschränkt. Die Detektion sehr nahe zusammenliegender Carboanhydrase-Banden als DNSA-Komplexe war oft noch möglich, wenn die beiden anderen Methoden die Heterogenität nicht oder nur gelegentlich erkennen liessen. So bekommt man bei Carboanhydrase aus

Human- oder Rindererythrocyten ohne weiteres zwei stärkere, aber dicht beieinander liegende fluoreszierende Banden und eine sehr schwache (Carboanhydrase A ist nur in relativ kleinen Mengen zu den Isoenzymen B und C vorhanden), mit der Esterasemethode [10] aber nur eine. Bei der Carboanhydrase aus Kaninchen- und Hühnererythrocyten konnten wir sogar vier bzw. fünf fluoreszierende Banden erkennen, gegenüber zwei mit der Esteraseanfärbung. Ausserdem ist bei dieser Methode eine Differenzierung der Carboanhydrase gegenüber den eigentlichen Esterasen durch Unterdrückung der Banden einem Parallelversuch durch Zusatz von Acetazolamid zur Inkubationsmischung keineswegs immer möglich. Dieses Verfahren versagt zum Beispiel bei Carboanhydrasen aus Hühnerblut. Die Ergebnisse mit der Cobaltsulfid-Methode [11, 12] sind mit der Esterasemethode vergleichbar. Sie ermöglicht gelegentlich eine bessere Erkennung der Heterogenität einer Bande, z.B. bei der Carboanhydrase aus Humanerythrocyten, die Methode lieferte jedoch in unseren Händen nur schlecht reproduzierbare Ergebnisse.

Wir danken Frau Gudrun Welge für ihre zuverlässige technische Assistenz.

Literatur

- [1] R.F. Chen and J.C. Kemohan, *J. Biol. Chem.* 242 (1967) 5813.
- [2] G. Weber, *Biochem. J.* 51 (1952) 155.
- [3] M. Tsuchihashi, *Biochem. Z.* 140 (1923) 63.
- [4] T.C. Wrigley, *Science Tools (LKB)* 15 (1968) 17.
- [5] L. Ornstein, *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 121 (1964) 321.
- [6] H.R. Maurer, *Diskelektrophorese, Theorie und Praxis der diskontinuierlichen Polyacrylamid-Elektrophorese* (W. de Gruyter, Berlin, 1968) p. 39.
- [7] D.M. Easton, H. Lipner, H. Hines and R.C. Leif, *Anal. Biochem.* 39 (1971) 478.
- [8] D.P. Borris and J.N. Aronson, *Anal. Biochem.* 32 (1969) 273.
- [9] K.R. Shelton, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 43 (1971) 367.
- [10] C.L. Markert and R.L. Hunter, *J. Histochem. Cytochem.* 7 (1959) 42.
- [11] A. Waldeyer and G. Häussler, *Acta Biol. Med. Ger.* 2 (1959) 68.
- [12] P.J. Wistrand and S.N. Rao, *Biochim. Biophys. Acta* 154 (1968) 130.