

Über die elektrophoretische Differenzierung und Klassifizierung von Proteinen, I
**Vergleichende Untersuchung der Proteine von Mikroorganismen
 mit der isoelektrischen Fokussierung in Polyacrylamidgelen**

On the Electrophoretical Differentiation and Classification of Proteins, I

Comparative Investigation of the Proteins of Microorganisms by Means
 of the Isoelectrical Focusing in Polyacrylamid Gels

F. Drawert, A. Görg und J. Bednár

Institut für Chemisch-technische Analyse und chemische Lebensmitteltechnologie der Technischen
 Universität München, Freising-Weihenstephan

(Z. Naturforsch. **28 c**, 764—767 [1973]; eingegangen am 17. Juli/27. August 1973)

Electrophoretical differentiation, proteins

By means of isoelectric focusing in polyacrylamid gels cell proteins of bottom — respectively topfermenting yeasts (*Saccharomyces cerevisiae*), *Pseudomonas ovalis* and *Achromobacter alcaligenes* were separated into over 30 peaks with a good reproducibility. The distribution pattern of the proteins is a base for a classification.

Wie wir bereits berichtet haben¹, ist es durch Anwendung der dünn-schicht-isoelektrischen Fokussierung (DIEF) in Schichten granulierter Gele möglich, Gersten- und Hefeproteine so aufzutrennen, daß anhand der Proteinverteilungsmuster (nach isoelektrischen Punkten pI) eine Grundlage für eine neue Klassifikation geschaffen ist. Die mit Hilfe der dünn-schicht-isoelektrischen Fokussierung in Sephadex G 75 Gel-Schichten durchgeführten Trennungen ergaben sehr gut reproduzierbare Ergebnisse. Eine vergleichende Studie der Ergebnisse bei untergärigen und obergärigen Hefen mit den pI-Proteinmustern von anderen Mikroorganismen (*Achromobacter* und *Pseudomonas*) hat gezeigt, daß sich die Muster grundsätzlich unterscheiden. Somit bietet sich eine Möglichkeit aufgrund einer neuen Klassifizierung nach den pI der Zellproteine auf der Basis des „Proteinspiegels“ vorhandene Klassifizierungen zu ergänzen bzw. zu bereichern. Über die Unterschiede der Proteine bei verschiedenen Mikroorganismen (Zellproteine), die mittels Elektrophorese festgestellt wurden, ist von verschiedenen Autoren bereits berichtet worden^{2–10}. Diese Arbeiten konnten indessen wenig zur Art- und Gattungsunterscheidung für taxonomische Zwecke beitragen.

Die guten Erfahrungen mit der Disk-Elektrophorese (PAGE) und mit der isoelektrischen Fokussie-

rung in Polyacrylamidgelen (PAGIEF) bei pflanzlichen Proteinen^{11, 12} haben uns veranlaßt, die isoelektrische Fokussierung der cytoplasmatischen Proteine auch in Polyacrylamidgelen durchzuführen. Voraussetzung für eine gute Reproduzierbarkeit der Trennergebnisse ist vor allem ein schonender Zellaufschluß und eine sorgfältige Weiterbehandlung der Proteine.

Material und Methoden

Die untergärigen (*Saccharomyces cerevisiae*, syn. *carlsbergensis*) bzw. obergärigen (*Saccharomyces cerevisiae*) Hefen entstammen der Bayerischen Staatsbrauerei Weihenstephan. Das Bakterium *Pseudomonas ovalis* 8209 stammt aus der Sammlung ATCC (American Type Culture Collection) und *Achromobacter alcaligenes* species aus der mikrobiologischen Abteilung der Fa. Boehringer Mannheim in Tutzing. Beide Mikroorganismen wurden in einer Hydroxyprolin-spezifischen Nährlösung bei 30 °C und kräftiger Belüftung kultiviert¹³.

Circa 30 g der entwürzten und bis circa 25% Trockensubstanz entwässerten Kulturen (Büchner-Trichter, resp. Zentrifuge) wurden nach dem Biox-X-Verfahren aufgeschlossen¹⁴. Die Bestimmung der Trockensubstanz erfolgte nach Ford¹⁵.

Die bei dem Biox-X-Verfahren eingefrorenen Zellen werden durch Druck und Druckentlastung zum Platzen gebracht, wobei das Cytoplasma nach dem Abtauen frei wird. Durch Zentrifugieren bei 20 000 × g bei 4 °C werden die Zellwände vom

Sonderdruckanforderungen an Prof. Dr. F. Drawert, Technische Universität München, Lehrstuhl für Chemisch-technische Analyse und chemische Lebensmitteltechnologie, D-8050 Freising-Weihenstephan.

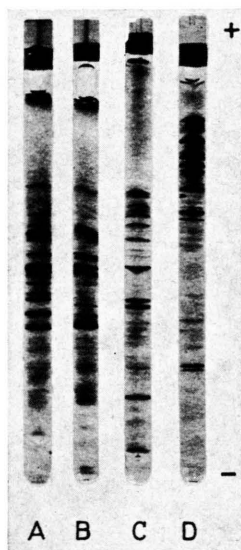


Abb. 3. Vergleichende Trenngele. A = untergärige Bierhefe; B = obergärige Bierhefe; C = *Pseudomonas*; D = *Achromobacter*.

Cytoplasma abgetrennt und dieses durch Lyophilisieren in Pulverform überführt. Die von Leaback und Rutter^{16, 17} und Awdeh, Williamson und Askonas¹⁸ für die Flachgel- und von Dale und Latner^{19, 20}, Wrigley^{21–23}, Fawcett²⁴, Riley und Coleman²⁵ und Catsimpoolas^{26, 27} für die Rundgel-Fokussierung beschriebenen Methoden der PAGIEF wurden von uns modifiziert¹¹ und in einer Apparatur für die Disk-Elektrophorese (Fa. Desaga, Heidelberg) durchgeführt. Die Trennung der Proteine erfolgte in 105 mm langen zylindrischen Trenngelen in 150 mm langen Glasröhrchen mit einem inneren Durchmesser von 5 mm. Das 7-proz. Trenngel wurde aus folgenden Lösungen hergestellt: 7,5 ml einer wäßrigen Lösung von 28,0 g Acrylamid und 0,735 g N,N'-Methylenbisacrylamid in 100 ml; 7,5 ml einer wäßrigen Lösung von 0,14 g Ammoniumperoxodisulfat in 100 ml; 1,5 ml Ampholine (LKB Producter Carrier Ampholyte 40% w/v, pH 3–10); 13,5 ml Wasser. Diese 30 ml Lösung reichen für 14 Glasröhrchen, die man in der Apparatur gleichzeitig laufen lassen kann.

Nach dem Polymerisieren des Gels werden 200 μ l einer 1–2-proz. Lösung aus dem cytoplasmatischen Pulver (0,5–1% Protein) langsam auf das Gel pipettiert, am besten mit einer automatischen Pipette (Eppendorf), und zwar so, daß man die Lösung an der Glaswand herunterfließen läßt. Für die Herstellung der Proteinlösung wird eine 25-proz. Saccharose-Wasserlösung verwendet. Über die Proteinlösung wird schließlich vorsichtig, am besten mit einer Spritze, eine 20-proz. Saccharose-Wasserlösung, die 2% Ampholine enthält, bis an den oberen Glasrand der Gelröhrchen geschichtet.

Als Elektrolyt werden im unteren Gefäß eine 2-proz. Äthylendiaminlösung (Kathode) und im oberen Gefäß eine 1-proz. Phosphorsäurelösung (Anode) verwendet. Während der Fokussierung wird die Apparatur auf +4 °C gekühlt.

Man schaltet pro Gelsäule auf konstante Stromstärke von 2 mA (28 mA) bis die angelegte Spannung auf 500 V angestiegen ist. Dann schaltet man auf konstante Spannung von 500 V um und fokussiert zuerst bis zum konstanten Stromabfall und dann noch eine Stunde weiter (Gesamtzeit circa 3 Stunden).

Nach der Fokussierung werden die Gele in den Röhrchen mit Hilfe einer Spritze mit langer Kanüle und Wasser von der Wand vorsichtig abgelöst, herausgenommen und zur Fixierung der Proteine und Auswaschen der Trägerampholyte in eine 12-proz. Trichloressigsäure-Lösung eingebracht. Das TCA-Bad wird zweimal nach je 1 Stunde gewechselt und dann über Nacht stehengelassen. Anschließend entfernt man das TCA aus den Gelen durch Waschen

mit einer Lösung aus Methanol : Eisessig : Wasser = 45 : 10 : 45. Nach dem Auswaschen wird dann 1–2 Stunden lang mit 0,1-proz. Coomassie Brilliant Blue G 250-Lösung (Serva) in Methanol : Eisessig : Wasser = 45 : 10 : 45 angefärbt und der überschüssige Farbstoff mit der gleichen Lösung ohne Farbstoff durch mehrmaliges Wechseln ausgewaschen. Man bewahrt die Gele in Reagenzgläsern in 7-proz. Eisessig auf.

Ergebnisse und Diskussion

Bei der isoelektrischen Fokussierung in Polyacrylamidgelen wurden die Zellproteine im Falle der Hefen in über 30 Banden aufgetrennt, wogegen bei der dünn-schicht-isoelektrischen Fokussierung höchstens 20 Banden zu erzielen waren (Abb. 1, 3 und 4).

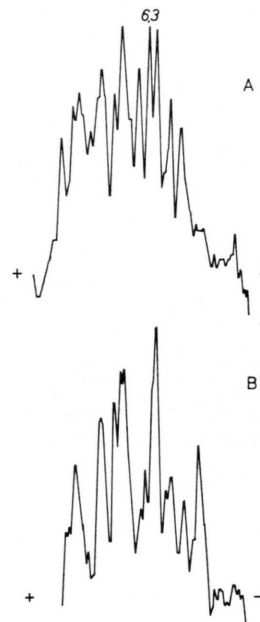


Abb. 1. Densitogramme der Protein-Verteilungsmuster von untergäriger Bierhefe (A) und obergäriger Bierhefe (B). Densitometer der Fa. Vitatron.

Ein wesentlicher Vorteil der isoelektrischen Fokussierung in Polyacrylamidgelen im Vergleich zur DIEF besteht auch in der Möglichkeit, ein 10-faches Volumen an Probe auftragen zu können. Dadurch kommen auch schwächere Proteinbanden zum Ausdruck, die man in der DIEF kaum nachweisen kann. Auf diese Weise ist es bei den Hefen möglich geworden, den Bereich von $pI = 6,35$ und höher, der bei der DIEF unbesetzt bleibt, für die Differenzierung der Proteine zu nutzen. Noch vorteilhafter wirkt sich die PAGIEF bei den Proteinmustern von *Achromo-*

bacter aus, wo mittels der DIEF 15 Peaks bis zum pI 5,9 erfaßt werden können, mit der PAGIEF aber darüber hinaus noch 22 (Abbn. 2 A, 3 und 4).

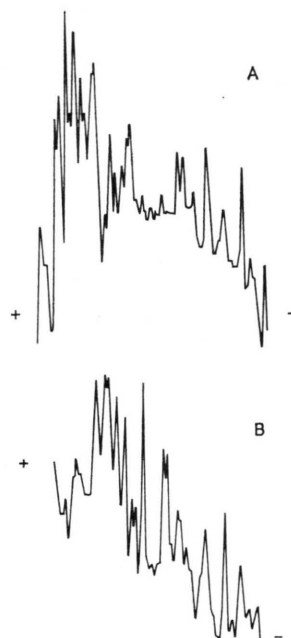


Abb. 2. Densitogramme der Protein-Verteilungsmuster von *Achromobacter alcaligenes* (A) und *Pseudomonas ovalis* (B).

Achromobacter unterscheidet sich ferner von den Hefen und von *Pseudomonas* besonders dadurch, daß in seinem Verteilungsmuster der „saure Bereich“ (pH 4,2) vergleichsweise stark mit Proteinen besetzt ist (Abbn. 2 B, 3 und 4).

Die Proteine von *Pseudomonas* liegen dagegen in einem Bereich, der mit den Hefeproteinen vergleichbar ist. Die relative Verteilung in diesem Bereich ist jedoch grundsätzlich unterschiedlich (Abbn. 3 und 4).

In Abb. 3 * werden die Trenngele in einer Gegenüberstellung abgebildet.

Trotz der nahen Verwandtschaft der beiden Bierhefen sind die beiden Muster von ober- und untergärigen Bierhefen verschieden. Die bei der untergärigen Hefe auftretenden Bande beim pI 6,3 fehlt bei der obergärigen. Weitere reproduzierbare Unterschiede sind aus den Abbn. 1, 3 und 4 erkennbar.

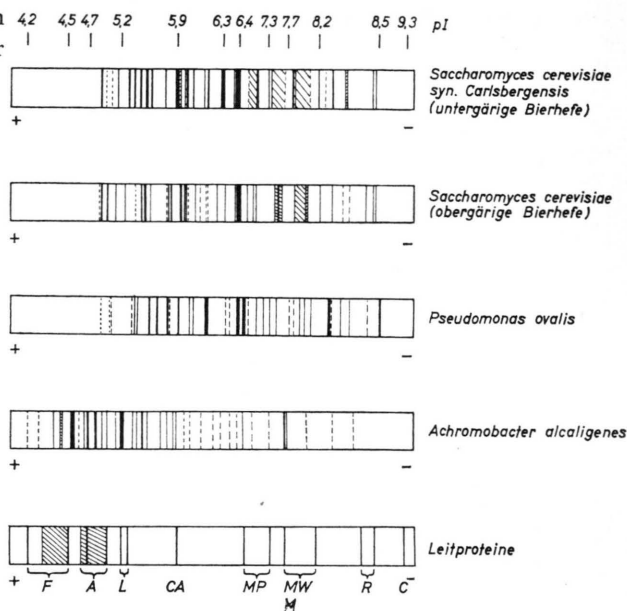


Abb. 4. IEF-Pherogramme im Vergleich zu Leitproteinen. F = Ferritin; A = Serumalbumin; L = β -Lactoglobulin; CA = Conalbumin; MP = Myoglobin (Pferd); MW = Myoglobin (Wal); R = Ribonuclease; C = Cytochrom C.

Die ausgewählten Beispiele zeigen, daß mit Hilfe der PAGIEF eine weit bessere Heterogenität der Proteine zu erreichen ist als mit der Disk-Elektrophorese bzw. der dünn-schicht-isoelektrischen Fokussierung. Selbst nah verwandte Hefen lassen sich reproduzierbar anhand ihres Proteinbestandes differenzieren. Damit dürfte eine brauchbare Basis zur Klassifizierung von Mikroorganismen gegeben sein.

In 11–17 Einzelbestimmungen pro Kultur beträgt die durchschnittliche Streuung der Einzelbande um den Mittelwert $\pm 5\%$. Diese Streuung ist insofern unerheblich, als das jeweilige Verteilungsmuster voll erhalten bleibt und entsprechende Korrekturen über relative Retentionsdaten möglich sind. Über vergleichende Extraktionsverfahren (Bio-X, Ultraschall, Zellhomogenisator und Lösungsmittel-extraktion) und deren Reproduzierbarkeit wird gesondert berichtet¹⁴.

* Abb. 3 siehe Tafel auf Seite 764 a.

¹ F. Drawert, B. J. Radola, W. Müller u. J. Bednář, Charakterisierung von Proteinen aus Gerste, Malz, Würze, Bier und Hefe mit Hilfe der dünn-schicht-isoelektrischen Fokussierung; Proc. 14th Congr. Europ. Brew. Conv., Salzburg 1973.

² A. Baillie u. J. R. Norris, J. appl. Bacteriol. **26**, 102–106 [1963].

³ I. Campbell, R. H. Gilmour u. P. R. Rous, J. Inst. Brewing **78**, 491–496 [1972].

⁴ D. C. Cann u. M. E. Willox, J. appl. Bacteriol. **28**, 165–173 [1965].

⁵ G. I. Lloyd, E. O. Morris u. J. E. Smith, J. gen. Microbiol. **63**, 141–150 [1970].

⁶ B. M. Lund, J. gen. Microbiol. **40**, 413–419 [1965].

⁷ J. R. Norris, J. appl. Bacteriol. **27**, 439–447 [1964].

- ⁸ K. Robinson, J. appl. Bacteriol. **29**, 179–184 [1971].
- ⁹ D. B. Stewart u. D. J. Stewart, J. gen. Microbiol. **65**, 175–184 [1971].
- ¹⁰ R. A. D. Williams u. S. A. Sadler, J. gen. Microbiol. **65**, 351–358 [1971].
- ¹¹ F. Drawert u. A. Görg, Chromatographia **5**, 268–273 [1972].
- ¹² F. Drawert u. A. Görg, in Vorbereitung.
- ¹³ H. Barton, Dissertation, Techn. Univ. München 1973.
- ¹⁴ F. Drawert u. J. Bednář, Chem. Mikrobiol. Technol. Lebensm., im Druck.
- ¹⁵ J. S. Ford, in Lehrbuch der Brauerei, Bd. II, p. 641, J. de Clerck ed., 1965.
- ¹⁶ D. H. Leaback u. A. C. Rutter, Biochem. J. **108**, 19 [1968].
- ¹⁷ D. H. Leaback u. A. C. Rutter, Biochem. biophysic. Res. Commun. **32**, 447 [1968].
- ¹⁸ Z. L. Awdeh, A. R. Williamson u. B. A. Askonas, Nature [London] **219**, 66 [1968].
- ¹⁹ G. Dale u. A. L. Latner, Lancet **7547**, 847 [1968].
- ²⁰ G. Dale u. A. L. Latner, Clin. chim. Acta [Amsterdam] **24**, 61 [1969].
- ²¹ C. W. Wrigley, J. chromatogr. [Amsterdam] **36**, 362 [1968].
- ²² C. W. Wrigley, Sci. Tools [Stockholm] **15**, 17 [1968].
- ²³ C. W. Wrigley, Protides Biol. Fluids Proc. Colloq. **17**, 417 [1969].
- ²⁴ J. S. Fawcett, FEBS letters **1**, 81 [1968].
- ²⁵ R. F. Riley u. M. K. Coleman, J. Lab. clin. Med. **72**, 714 [1968].
- ²⁶ N. Catsimpoolas, Analyt. Biochem. [New York] **26**, 480 [1968].
- ²⁷ N. Catsimpoolas, Clin. chim. Acta [Amsterdam] **23**, 237 [1969].