

Charakterisierung der Proteine von Muskelfleisch und inneren Organen von Rind und Schwein mit Hilfe der SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese

K. HOFMANN

Bundesanstalt für Fleischforschung, Kulmbach, Bundesrepublik Deutschland

Die Proteine von Skelettmuskel, Herz, Leber, Lunge, Niere und Milz von Rind und Schwein wurden auf Gelplatten aus Polyacrylamid in Gegenwart von Natriumdodecylsulfat (SDS) elektrophoretisch getrennt. Für beide Tierarten konnte folgendes festgestellt werden:

Die einzelnen Gewebearten sind durch unterschiedliche, charakteristische Proteinbandenmuster gekennzeichnet. Die Anwendung der SDS-Elektrophorese ermöglicht daher - unabhängig von ihrer histologischen Beschaffenheit - die Identifizierung von Gewebearten in Fleischwarenproben. Dabei genügt es meist, die Bandenmuster der zu untersuchenden Proben mit den bekannten Mustern der obengenannten Gewebe visuell zu vergleichen. Eine exakte Identifizierung ist aufgrund der Molekulargewichtsbestimmung möglich, die an Hand der Wanderstrecken der einzelnen Proteinbanden vorgenommen werden kann.

Die Intensität der einzelnen Banden in den Bandenmustern unterliegt in vielen Fällen gewissen, jedoch untypischen Schwankungen. Die Ursache hierfür liegt möglicherweise in unterschiedlichen, tierphysiologischen Faktoren begründet.

Characterization of Proteins in Muscles and Internal Organs of Beef and Pork with the Help of the SDS Polyacrylamide Gel Electrophoresis

K. HOFMANN

Bundesanstalt für Fleischforschung, Kulmbach, Federal Republic of Germany

The proteins of skeletal muscle, heart, liver, lung, kidney and spleen of beef and pork were separated electrophoretically on gel slabs of polyacrylamide in presence of sodium dodecyl sulfate (SDS). For both species of animals the following results have been obtained:

All kinds of tissue are marked by different characteristic protein patterns. Therefore the utilization of the SDS-electrophoresis enables the identification of different tissues in meat products, irrespective of their histological character. In most of the cases it is sufficient to compare the patterns of the samples which have to be examined with the known patterns of the above mentioned tissue visually. An exact identification is possible by determination of the molecular weight, which can be executed with the help of the distance of the different protein subunits from the origin.

The intensity of the different bands in the patterns show in many cases certain, but untypical fluctuations. The reasons for this may be due to the different physiological factors in the animals.

L 2:2

Caractériser des protéines de viande musculaire et des organes internes des bovins et du porc à l'aide de SDS polyacrylamide gel electrophoresis

K. HOFMANN

Bundesanstalt für Fleischforschung, Kulmbach, République Fédérale d'Allemagne

Les protéines de muscle squelette, du cœur, du foie, du poumon, du rein et de la rate du bovin et du porc ont été séparées électrophorétiquement sur des plaques de gel en polyacrylamide en présence de natriumdodecylsulfate (SDS). Pour les deux espèces d'animaux on a constaté le suivant:

Les genres de tissu sont marqués par des différents dessins de protéine caractéristiques. C'est pourquoi l'utilisation du SDS électrophoresis permet - indépendamment de sa nature histologique - l'identification de genres de tissu dans les prélèvements de viande. Pour l'ordinaire il est suffisant à comparer visuellement les dessins des prélèvements qui sont à examiner avec les dessins connus des tissus susnommés. Une exacte identification est possible à cause de la détermination du poids moléculaire, qui peut être exécutée à l'aide de la distance des différentes unités subordonnées de l'origine.

L'intensité des différentes bandes dans les dessins montre souvent certaines fluctuations qui ne sont pourtant pas typiques. La raison pour cela sont éventuellement des différents facteurs physiologiques.

Характеризация белков мышц и внутренних органов крупного рогатого скота и свиньи с помощью SDS полиакриламид-гел электрофореза

К. ХОФМАНН

Всесоюзный Институт исследования мяса, Кулмбах, Германия

Белки мышц, сердца, печени, легких, почек и селезенки крупного рогатого скота и свиньи разделяли электрофорезом на гел-пластинках полиакриламида в наличии додецил сульфата натрия (SDS). У обеих категориях животных получены следующие результаты:

Отдельные ткани отличаются различными, характеристичными полосами. Применение SDS электрофореза потому делает возможным идентификацию сортов тканей в пробах мясных продуктов, независимо от их гистологических качеств. В большинстве случаев достаточно сравнить визуальную полосу исследуемой пробы с полосами выше перечисленных тканей. Точная идентификация возможна через определенные молекулярного веса на основе расстояния отдельных белковых полос от исходной точки.

Интенсивность различных полос в пробах показывает в многих случаях известные, но не типичные отступления. Причиной могут быть разные физиологические факторы животных.

Charakterisierung der Proteine in Muskeln und inneren Organen von Rind und Schwein mit Hilfe der SDS^{*)}-Polyacrylamidgel-Elektrophorese

KLAUS HOFMANN

Bundesanstalt für Fleischforschung, Kulmbach, Bundesrepublik Deutschland

Einleitung

Die Anwendung der Elektrophorese auf die Trennung und Bestimmung von Proteinen hat mit der Einführung der SDS-Elektrophorese durch SHAPIRO u. Mitarb. (1967), die eine gleichzeitige Bestimmung der Molekulargewichte der Proteine ermöglicht, einen bedeutenden Aufschwung erfahren. Auch auf dem Gebiet der Fleischforschung ist die SDS-Elektrophorese mehrfach angewendet worden, wie z.B. zur Charakterisierung der Protein-Untereinheiten der Muskelproteine (SCOPES und PENNY, 1971) oder zur Identifizierung und Bestimmung von Fremdproteinen in Fleischwaren (PENNY u. HOFMANN, 1971; HOFMANN u. PENNY, 1971, 1973; HOFMANN, 1973, 1977a, 1977b; MATTEY, 1974; LACOURT u. Mitarb., 1977; PERSSON u. APPELQVIST, 1977). Bei der SDS-Elektrophorese werden Proteinmoleküle, die im nativen Zustand aus Untereinheiten zusammengesetzt sind, durch die denaturierende Wirkung des SDS in ihre Untereinheiten aufgespalten. Unterschiede bei nativen Proben, die etwa auf dem Vorhandensein unterschiedlicher Bindungen in Proteinkomplexen beruhen, können somit bei Anwendung der SDS-Elektrophorese nicht erkannt werden. In analytischer Hinsicht ist dies jedoch eher ein Vorteil, denn die Ergebnisse sind hierdurch von denaturierenden und anderen Einflüssen, wie z.B. Temperatur- und pH-Schwankungen, weitgehend unabhängig. Damit ist eine hohe Reproduzierbarkeit und Vergleichbarkeit der erzielten Resultate gegeben.

Eine interessante Anwendung fand die SDS-Elektrophorese bei der Untersuchung von Schlachtnebenprodukten durch YOUNG u. LAWRIE (1974, 1975), z.B. zur Charakterisierung der extrahierbaren Proteine des Magens und der Lunge verschiedener Schlachttiere.

Zielsetzung

In der vorliegenden Arbeit wurde die SDS-Elektrophorese zur Charakterisierung verschiedener innerer Organe von Rind und Schwein (Herz, Leber, Niere, Lunge und Milz) angewendet. Die Charakterisierung dieser Gewebe auf Grund ihrer Proteinmuster ist gleichzeitig ein Beitrag zur Untersuchung und Erkennung von in Fleischwaren verarbeiteten Organen. Dabei ist es - im Gegensatz zu histologischen und immunchemischen Nachweismethoden - unerheblich, ob die Proben im mehr oder weniger stark zerkleinerten, im nativen oder im denaturierten Zustand vorliegen.

Zum Zwecke des Vergleichs wurden außerdem Skelettmuskeln (M. long. dorsi) von Rind und Schwein untersucht.

Experimenteller Teil

Probenvorbereitung. a) Gesamtgewebe: Ca. 50 g frisches Gewebe wurden zunächst mit dem Messer in kleine Würfel zerschnitten und mit Hilfe des Gerätes "Moulinex" feinerzkleinert. Die Proben wurden bis zur Analyse im Kühlschrank bei +2°C aufbewahrt. Zur Elektrophorese wurden je nach Proteingehalt (die Konzentration betrug ca. 10 mg Protein/ml) 40 - 70 mg des feinerzkleinerten Materials in 2 ml Borsäure-Tris-Puffer pH 8,2 (1 % SDS und 1 mg Dithioerythrit enthaltend) unter Erwärmen (20 Minuten im siedenden Wasserbad) gelöst. Alle Gewebeproben lösten sich vollständig, ausgenommen Skelettmuskel. In diesem Fall wurde der Rückstand (Collagen) niedertourig (bei ca. 1000 g) abzentrifugiert.

b) Gewebe-Extrakte: 10 g des feinerzkleinerten Gewebes wurden mit 75 ml einer eiskalten 0,1 M KCl-Lösung im Bühler-Homogenisator unter Eiskühlung 1 Minute lang bei maximaler Drehgeschwindigkeit homogenisiert. Anschließend wurde 30 Minuten gerührt. Zur Abtrennung von Ungelöstem zentrifugierte man 20 Minuten bei 18 000 g. Zur Abtrennung von oben auf schwimmendem Fett wurde der Überstand nochmals in ein Faltenfilter gegeben, wonach man ein klares Filtrat erhielt. Für die Elektrophorese wurde 1 ml Extrakt wie unter a) mit Puffer versetzt und erwärmt.

Elektrophorese. Die Elektrophorese wurde nach HOFMANN u. PENNY (1973) in Gelplatten aus Polyacrylamid (Konzentration: 8 %, Vernetzer: 1/30) in Gegenwart von Borsäure-Tris-Puffer pH 8,2 und 0,1 % SDS sowie 0,1 % Mercaptoethanol durchgeführt. Die angelegte Spannung betrug 250 V, die resultierende Stromstärke ca. 40 mA. Dauer der Elektrophorese: 4 Stunden. Die Anfärbung der Proteinbanden erfolgte mittels Coomassie Blue R 250 (Fa. Serva).

Auswertung. Von den angefärbten Gelplatten wurden mit Hilfe eines integrierenden Densitometers ("Densimon" und "MO-Quant" der Fa. Moltronic, Heidelberg) Kurven (Densitogramme) aufgezeichnet und gleichzeitig die prozentualen Flächenanteile der einzelnen, den Proteinen und Proteinuntereinheiten entsprechenden Peaks registriert. Der dem Probeschlitz des Gels entsprechende Peak wurde rechnerisch eliminiert. Die Größe der Peakflächen ist ein Maß für die Konzentration der Proteine im Gel. Da jedoch die Anfärbbarkeit der Proteine verschieden sein kann, stehen die Konzentrationen der verschiedenen Proteine nicht notwendiger Weise im gleichen Verhältnis wie ihre Peakflächen (nur bei einander identischen Protein-

*) SDS = Natriumdodecylsulfat

banden kann dies vorausgesetzt werden).

Zwischen den Laufstrecken der Proteine (Entfernung vom Probeschlitz bis zur Bande) und dem dekadischen Logarithmus ihrer Molekulargewichte besteht im Bereich von 10 000 bis 100 000 Dalton eine lineare Beziehung, die es gestattet, mit Hilfe von Proteinen bekannten Molekulargewichts (Proteinstandards) Molekulargewichtsbestimmungen vorzunehmen (SHAPIRO u. Mitarb., 1967; WEBER u. OSBORN, 1969). Zur genaueren Abmessung der Laufstrecken wurden diese jedoch in der vorliegenden Arbeit nicht an den Gelen selber, sondern an Hand der Densitogramme ermittelt (HOFMANN u. PENNY, 1973).

Ergebnisse und Diskussion

Die Ergebnisse sind in verschiedener Form dargestellt: In Abbildungen von Originalgelen (Abb. 1), Faksimiles (Abb. 2) und Densitogrammen (Abb. 3). Die Molekulargewichte der Proteine bzw. ihrer Untereinheiten und die quantitative Verteilung der angefärbten Banden im Densitogramm sind in Tabelle 1 und 2 zusammengefaßt.

a) Gesamtgewebe. Die Skelettmuskeln und inneren Organe von Rind und Schwein sind durch charakteristische Muster der Proteinbanden bzw. Kurvenbilder gekennzeichnet (siehe Abb. 1, 2 und 3). Eine Identifizierung dieser Gewebeatrten kann daher im allgemeinen schon auf Grund eines visuellen Vergleichs der Elektropherogramme der fraglichen Proben mit den hier dargestellten Bandenmustern erfolgen. Wie frühere Untersuchungen über den Nachweis von Fremdeiweiß in Fleischwaren gezeigt haben, können die einzelnen Proteinquellen auch dann, wenn sie miteinander vermischt und ihre Bandenmuster voneinander genügend verschieden sind, ohne weiteres identifiziert werden, da das Elektropherogramm eines Proteingemisches der Aufeinanderprojektion der Elektropherogramme der Einzelproteine entspricht und diese sich gegenseitig in ihrer Lage nicht beeinflussen (HOFMANN, 1973, 1977b). Gleiches gilt zweifellos auch für andere Proteinquellen, wie die hier untersuchten inneren Organe, die somit im Gemisch mit anderen Proteinen, wie in Fleischwaren, identifiziert werden können. Sind die Bandenmuster zweier Organe jedoch einander sehr ähnlich, wie im Falle von Herz- und Skelettmuskel, so ist eine Identifizierung kaum möglich (vergl. Abb. 1 u. 2).

Auch die Bandenmuster von Niere und Lunge sind auf den ersten Blick einander überraschend ähnlich (s. Abb. 1). Sie unterscheiden sich jedoch in charakteristischer Weise in der Intensitätsverteilung der Banden (s. Tab. 2). Besonders augenfällig ist bei Lunge die sehr stark ausgeprägte Bande des Hämoglobins (Bande 13). Die Bandenmuster derselben Gewebeatrten von Rind und von Schwein gleichen einander weitgehend. Im Falle von Skelettmuskel jedoch ist die Bande des Myoglobins (Nr. 16) bei Rind stärker ausgeprägt als bei Schwein.

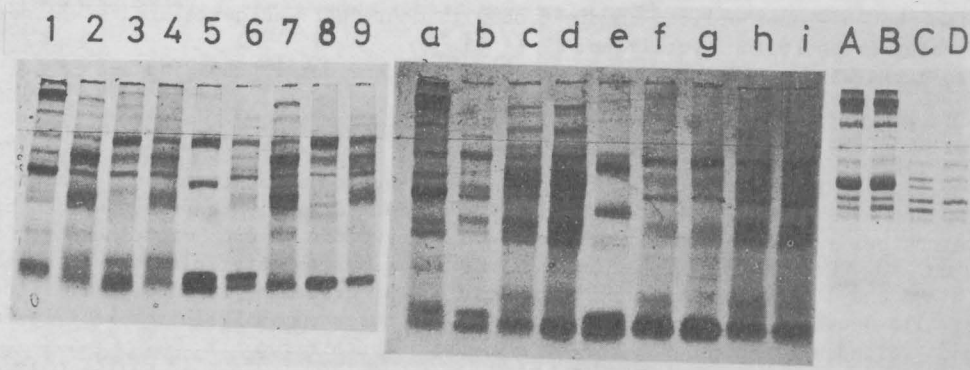


Abb. 1: Elektropherogramme von SDS-Polyacrylamidgelen.

1 - 9: Innere Organe vom Rind und Organextrakte: 1 Herz, 2 Leber, 3 Lunge, 4 Niere, 5 Proteinstandard, 6 Herzextrakt, 7 Leberextrakt, 8 Lungenextrakt, 9 Nierenextrakt.

a - i: Innere Organe vom Schwein und Organextrakte: a Herz, b Herzextrakt, c Leber, d Leberextrakt, e Proteinstandard, f Lunge, g Lungenextrakt, h Niere, i Nierenextrakt.

A - D: Muskel (M. long. dorsi) und Muskelextrakte: A Rindermuskel, B Schweinemuskel, C Rindermuskelextrakt, D Schweinemuskelextrakt.

Der Start (Probeschlitz) befindet sich am oberen Rand der Gele.

Fig. 1: Electropherograms of SDS polyacrylamide gels.

1 - 9: Internal organs of bovine and organ extracts of: 1 heart, 2 liver, 3 lung, 4 kidney, 5 marker proteins, 6 heart extract, 7 liver extract, 8 lung extract, 9 kidney extract.

a - i: Internal organs of porcine and organ extracts of: a heart, b heart extract, c liver, d liver extract, e marker proteins, f lung, g lung extract, h kidney, i kidney extract.

A - D: Muscles (M. long. dorsi) and muscle extracts: A bovine muscle, B porcine muscle, C extract of bovine muscle, D extract of porcine muscle.

The slots for the samples are placed on top of the gels.

Tabelle 1: Molekulargewichte der Proteine verschiedener Gewebe (Rind) (Mittelwerte aus je 5 Bestimmungen). Die Nummern bezeichnen die Lage der Banden, s. Abb. 2

Table 1: Molecular weights of the proteins of different tissues (bovine) (mean values of 5 assays each). The numbers sign the position of the bands, see Fig. 2

Nr.	Muskel (muscle)	Herz (heart)	Leber (liver)	Niere (kidney)	Lunge (lung)	Milz (spleen)
1	100 000	100 000	100 000	91 700	100 000	74 000
2	100 000	100 000	100 000	88 300	100 000	59 300
3	92 600	92 000	91 300	83 000	89 000	55 000
4	79 200	80 000	79 000	72 400	69 800	51 500
5	69 200	-	71 700	70 000	63 000	-
6	60 000	72 000	-	61 000	58 200	39 000
7	-	61 000	58 300	56 000	55 300	-
8	-	43 000	55 500	50 000	49 000	20 000
9	47 000	40 000	49 800	41 800	40 500	18 500
10	41 600	37 000	46 000	38 800	35 300	15 500
11	37 700	28 500	38 700	35 500	20 100	-
12	34 600	26 000	35 500	20 000	19 000	-
13	25 200	23 000	28 700	18 000	15 600	-
14	22 700	17 500	20 300	16 000	-	-
15	-	15 500	16 000	-	-	-
16	17 600	-	-	-	-	-

Tabelle 2: Intensität der Proteinbanden (Mittelwerte in %)

Table 2: Intensity of the protein bands (mean values in %)

Nr.	Muskel (muscle)	Herz (heart)	Leber (liver)	Niere (kidney)	Lunge (lung)	Milz (spleen)
1			2,7	1,2	3,0	3,3
2	} 22,2	} 14,8	1,6		2,7	5,8
3		4,6	2,7	} 4,5	2,5	-
4	5,9			9,7	13,6	12,2
5	1,5	2,2	} 6,4	3,2		
6	3,1	-		8,1	} 10,7	} 8,2
7	4,4	6,5		5,5		
8	-	7,1	} 21,8	8,7	8,9	17,2
9	-	23,0		7,3	7,8	7,4
10	26,0	5,4	7,2	7,4	6,3	30,3
11	4,6	4,8	-	6,1	11,8	
12	7,7	} 6,5	} 23,3	9,2	4,1	
13	3,5		4,5	5,0	25,0	
14	3,1	- 2,8	10,2	17,0		
15	2,9	} 22,1	11,7			
16	-					
	13,3					

YOUNG u. LAWRIE (1974, 1975) fanden, daß auch die Proteine der Lungenextrakte verschiedener Tierarten einander sehr ähnliche Bandenmuster ergaben.

b) Gewebeextrakte. Beispiele der Bandenmuster von Gewebeextrakten sind aus Abb. 1 zu ersehen. Zwischen den Bandenmustern der Organextrakte und denen der Gesamtorgane besteht weitgehende Übereinstimmung. Dieses Ergebnis ist durchaus überraschend, denn es entspricht nicht den Befunden bei Skelettmuskel (vergl. Abb. 1, A-C), die bereits von früheren Untersuchungen bekannt sind (HOFMANN, 1973). Das Ergebnis bei Organen deckt sich mit der von YOUNG und LAWRIE (1974) geäußerten Feststellung, "daß die nativen Proteine zum größten Teil in den Extrakten von niedrigen Salzkonzentrationen wiedergefunden werden können". Einige Unterschiede bestehen jedoch zwischen den Bandenmustern der Organe und der Extrakte: So ist vor allem die dem Molekulargewicht von 20 000 entsprechende Proteinbande in den Mustern der Extrakte von Leber, Niere und Lunge im Gegensatz zu denen von Gesamtgewebe nur noch sehr schwach vertreten. Es sei erwähnt, daß die von YOUNG u. LAWRIE (1974) wiedergegebenen densitometrischen Kurven für Lungengewebe vom Schaf und Rind mit den in der vorliegenden Arbeit erhaltenen sehr gut übereinstimmen. Hierin kommt die hervorragende Reproduzierbarkeit der SDS-Elektrophorese sowie eine Bestätigung der obigen Feststellung zum Ausdruck, daß die Proteinmuster gleicher Organe bei verschiedenen Tierarten einander weitgehend entsprechen.

Im Fall von Skelettmuskel und Herz ist festzustellen, daß in den Mustern der Extrakte die Banden der hochmolekularen Proteine, vor allem die des Myosins (MG 100 000) und des Actins (MG 43 000) (s. Tab. 1) ganz oder weitgehend fehlen.

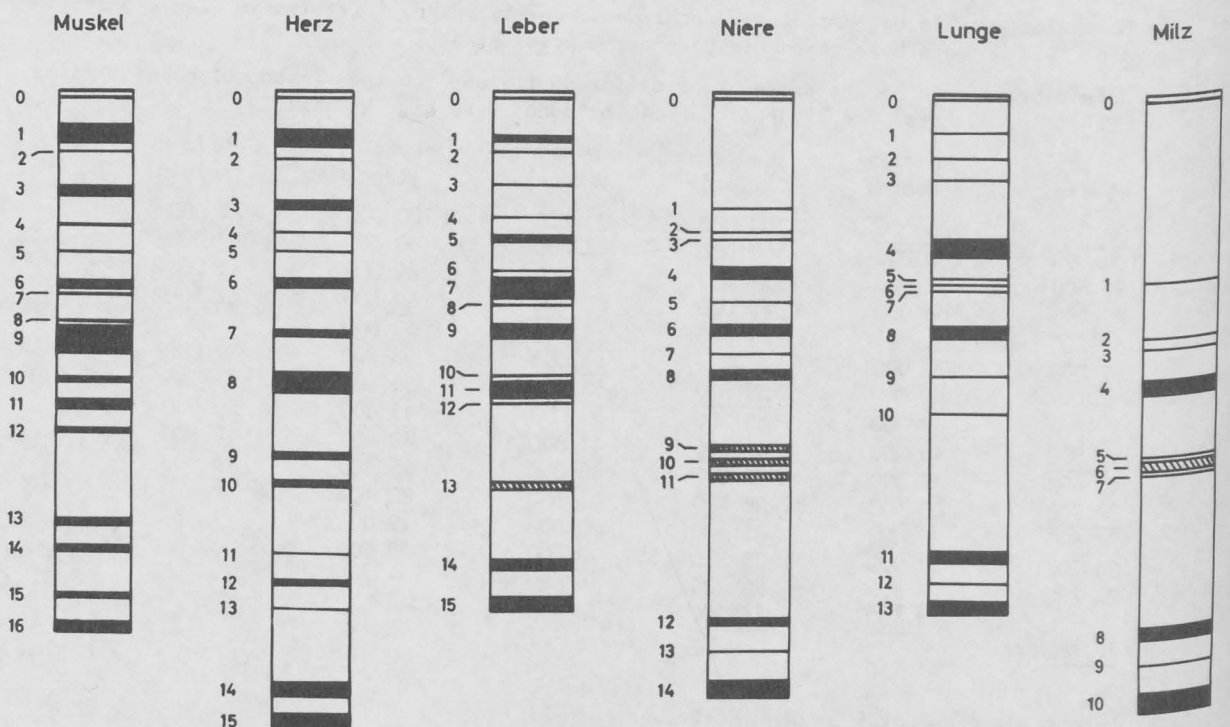


Abb. 2: Faksimiles der angefärbten Proteinbanden der untersuchten Gewebe in SDS - Elektrophoresegelelen.

Fig. 2: Facsimiles of the stained protein bands of tissues in SDS polyacrylamide gels.

c) Anmerkung zu den Abbildungen und Tabellen: In den Faksimiles (Abb. 2) sind nur die in den Originalgelen eindeutig sichtbaren Banden dargestellt. Sie sind durchgehend, beginnend beim Probeschlitz, der mit 0 gekennzeichnet ist, nummeriert. Die einander entsprechenden Banden und Peaks in den Faksimiles, Densitogrammen (Abb. 2 bzw. 3) und den Tabellen sind durch die gleichen Zahlen gekennzeichnet. Infolge des begrenzten Auflösungsvermögens des Densitometers finden sich in den densitometrischen Kurven nicht alle Banden in Form getrennter Peaks wieder. In diesen Fällen sind die Zahlen an den Kurven weggelassen. Diffuse oder ungenügend getrennte Banden sind in den Faksimiles schraffiert dargestellt.

Die unterschiedliche Länge der Gelplatten in Abb. 1 beruht auf einer unterschiedlichen Quellung oder Schrumpfung der Gele. Dies ist auch der Grund für die ungleiche Länge der Faksimiles und der Densitogramme.

In den Tabellen sind die Molekulargewichte und die Intensitätswerte der am stärksten erscheinenden Proteinbanden durch Unterstreichung hervorgehoben. Der Berechnung der Molekulargewichte und der Intensität der Banden wurden die Meßwerte von jeweils fünf Proben je Gewebe- und Tierart zugrundegelegt.



Abb. 3: Densitometrische Kurven von Elektrophoresegelel mit den Proteinbanden verschiedener Gewebearten.

Fig. 3: Densitometric curves of electrophoretic gels containing the protein bands of different tissues.

Literatur

- HOFMANN, K. und PENNY, I.F. 1971. *Fleischwirtschaft* **51**, 577. HOFMANN, K. 1973. *Z. Anal. Chem.* **267**, 355.
 HOFMANN, K. und PENNY, I.F. 1973. *Fleischwirtschaft* **53**, 252. HOFMANN, K. 1977a. In: T. Høyem u. O. Kvåle (Hrsgb.) "Physical, Chemical and Biological Changes in Food Caused by Thermal Processing". *Appl. Sci. Publ. Ltd. London*, S. 311. HOFMANN, K. 1977b. *Ann. Nutr. Alim.* **31**, 207. LACOURT, A., MALICROT, M.-T. u. DAUPHANT, J. 1977. *Ann. Nutr. Alim.* **31**, 217. MATTEY, M.E. 1974. *Food Res. Abstr. Circ.*, No. 518, citing Smith, P.R. (1974). 10th Anniversary Symposium: Meat and Meat Products, Institute of Food Science and Technology, Leatherhead, Surrey, UK. PENNY, I.F. u. HOFMANN, K. 1971. *Proceed. 17th Europ. Meeting Meat Res. Workers, Bristol*, S. 809. PERSSON, B. u. APPELQVIST, L.A. 1977. *Ann. Nutr. Alim.* **31**, 141. SHAPIRO, A.L., VINUEL, E. u. MAIZEL, J.V. 1967. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **28**, 815. WEBER, K. u. OSBORN, M. 1969. *J. Biol. Chem.* **244**, 4406. YOUNG, R.H. u. LAWRIE, R.A. 1974. *J. Food Technol.* **9**, 69. YOUNG, R.H. u. LAWRIE, R.A. 1975. *J. Food Technol.* **10**, 532.

Danksagung

Herrn E. Blüchel danke ich für seine wertvolle Mitarbeit.

Handwritten text, possibly a list or notes, very faint and illegible.

Handwritten text, possibly a list or notes, very faint and illegible.

Handwritten text, possibly a list or notes, very faint and illegible.