

Uit de laboratorium praktijk

Vergelijking van de kwalitatieve bepaling van humane sialo-transferrinen met de IEF en HPLC

H.G. van EIJK, M.M. GEELHOED-MIERAS, M.J. KROOS en W.L. van NOORT

Enige jaren geleden publiceerden wij in dit tijdschrift een methode voor de scheiding van sialo-transferrinen in humaan serum met behulp van kant en klare Immobiline Dry Plate gels (Pharmacia, Biotech) bij een pH gradiënt van 5,1 - 6,1 in het Multipor systeem (1). Deze methode maakt nauwkeuriger kwantificeren mogelijk, doordat de scheiding aanzienlijk beter is dan in gels met ampholinen. Vooral voor het aantonen van overmatig alcohol gebruik dient kwantificering van de 0-, 1- en 2- sialo-transferrinefracties met de grootst mogelijke nauwkeurigheid te geschieden.

Reeds in 1979 beschreef Stibler et al. (2) een verandering in de microheterogeniteit van transferrine in relatie tot overmatige alcohol consumptie. Hoewel er twee decennia lang vele artikelen verschenen zijn, is er tot op heden nog steeds geen duidelijkheid over de meest optimale bepalingmethode voor de sialo-transferrinen (3,4,12). Het aantal vals positieve en vals negatieve uitslagen varieert sterk en ook de specificiteit en sensitiviteit is vaak te laag.

Kortom, een hoge nauwkeurigheid in de bepaling van sialo-transferrine is gewenst.

Renner en Kanitz claimen een goede bepaling met de HPLC (3).

In dit artikel beschrijven wij onze resultaten van de vergelijking van de HPLC en de IEF methode, zowel voor een mengsel van zuivere sialo-transferrinen (0-5 sialo-transferrinen) als voor normaal serum.

MATERIAAL en METHODEN

- Sialo-transferrinen met 0-5 sialo-eenheden werden via preparatieve IEF geïsoleerd (5).
- Normale sera en sera van CDG type 1 patiënten werden gebruikt (6).
- De IEF methode met Immobiline gels en apparatuur is door ons elders uitvoerig beschreven (6,8).
- Scheiding via HPLC werd uitgevoerd volgens (9) met de hieronder vermelde aanpassingen.

Chemische Pathologie, Faculteit der Geneeskunde en Gezondheidswetenschappen, Erasmus Universiteit Rotterdam

Correspondentie: Prof. Dr. H.G. van Eijk, Afd. Chemische Pathologie, Kamer EE 600, Erasmus Universiteit Rotterdam, Postbus 1738, 3000 DR Rotterdam.
Ingekomen: 16.10.98

Apparatuur

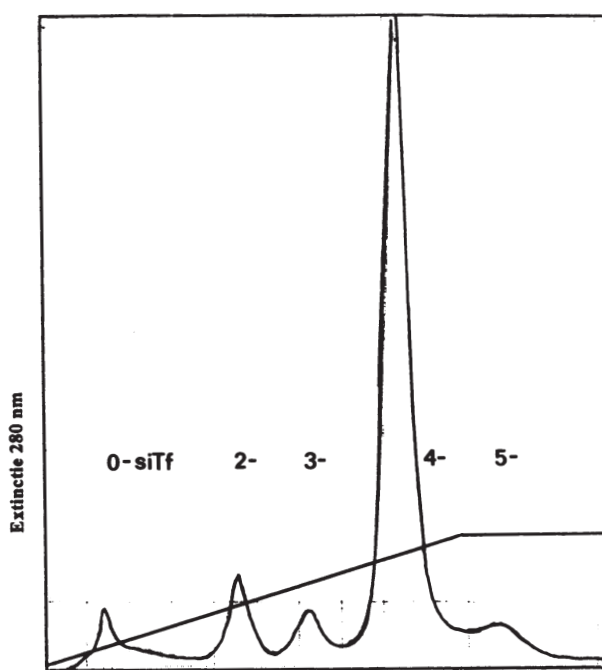
Kolom met sterke anionen wisselaar Poros HQ (0,46 x 5,0 cm) Boehringer Mannheim. Pomp, 2 x 2150 (Pharmacia). Variabele golflengte monitor 2151 (Pharmacia). Controller, 2152 (Pharmacia). Fractieverzamelaar, 2211 Superrac Pharmacia. Integrator, D-2000 Merck Hitachi. Recorder, 2210, 2 kanaals Pharmacia.

Analyse

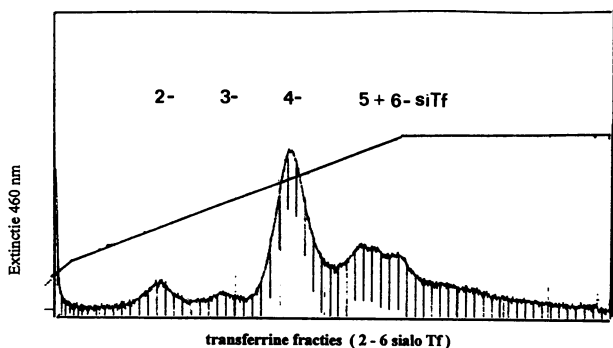
Mengsels van gezuiverde sialo-transferrinen en sera worden als volgt geanalyseerd (9).

Het serum wordt van te voren met ijzer verzadigd en gedelipideerd.

Aan 1 ml serum wordt 25 µl NaHCO₃ 0,5 M en 18 µl (Fe(III)) citraat 10 mM toegevoegd. Na incubatie overnacht bij 4°C wordt 10 µl dextraansulfaat (100 g/l) en 50 µl CaCl₂ 1 M toegevoegd. Na 1 uur bij 4°C wordt in een Eppendorf centrifuge 10 min. afgedraaid, het supernatant wordt 4 x verdund met aquabidest, waarna 500 µl op de Poros HQ kolom gebracht wordt, aangesloten op de HPLC apparatuur van Pharmacia. De absorptie wordt gemeten bij 460 (IJzer-Tf)



Figuur 1. Het scheidingspatroon van een mengsel van de zuivere sialo-transferrinen d.m.v. HPLC, gemeten bij 280 nm. Chromatogram voor patroonherkenning.



Figuur 2. Het scheidingspatroon van sialo-transferrinen in normaal serum d.m.v. HPLC. Gemeten werd bij 460 nm (Tf.2Fe).

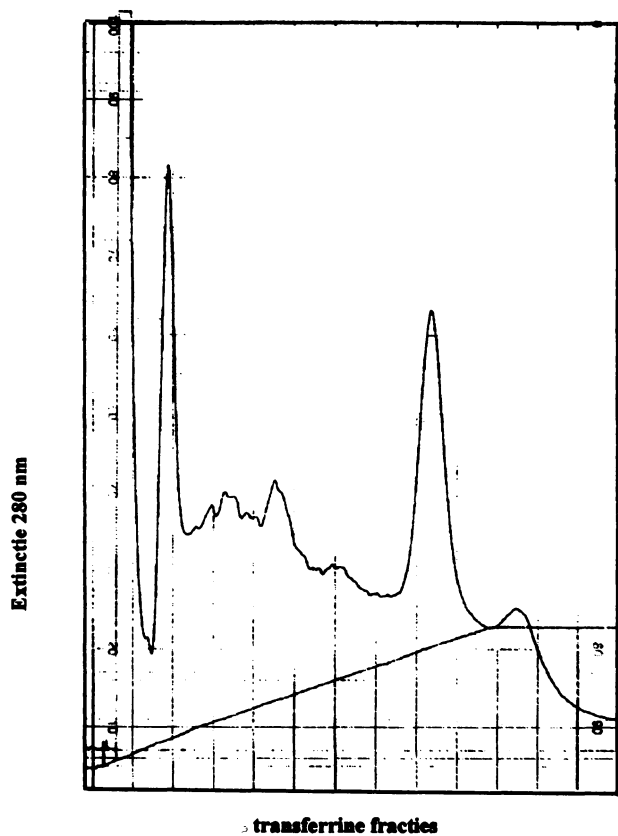
en/of 280 nm (eiwit). De scheiding wordt geëffectueerd door een Cl^- -gradiënt in een buffersysteem bestaande uit: buffer A, 20 mM Bis-Tris pH = 6,1 en buffer B, 20 mM Bis-Tris pH = 6,0 + 0,3 M NaCl.

Beide buffers bevatten 0,02% natriumazide en worden voor gebruik gefiltreerd over een 0,45 μm filter. De buffers worden ontgast met helium. Voor alle oplossingen wordt water van de hoogste zuiverheid verkregen door gebruik van een Milli-Q UF unit.

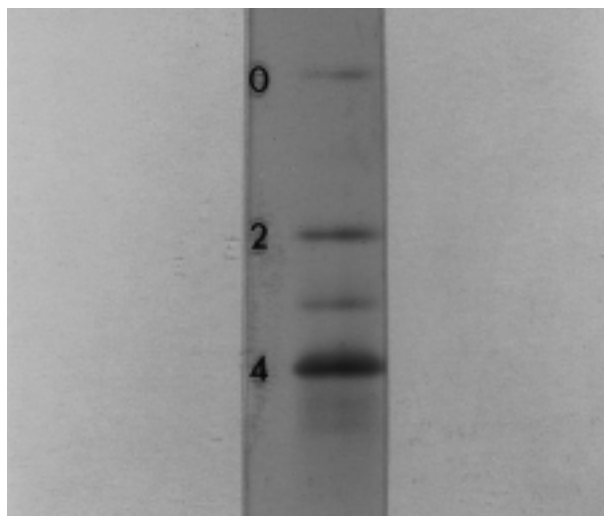
Direct na het injecteren van het monster (500 μl) wordt de gradiënt gestart.

Samenstelling van de gradiënt

Buffer B oplopend van 0-5% in de eerste 6 ml (1 ml per fractie), buffer B oplopend van 6-18% in de vol-



Figuur 3. Het scheidingspatroon van normaal serum d.m.v. HPLC, gemeten bij 280 nm.



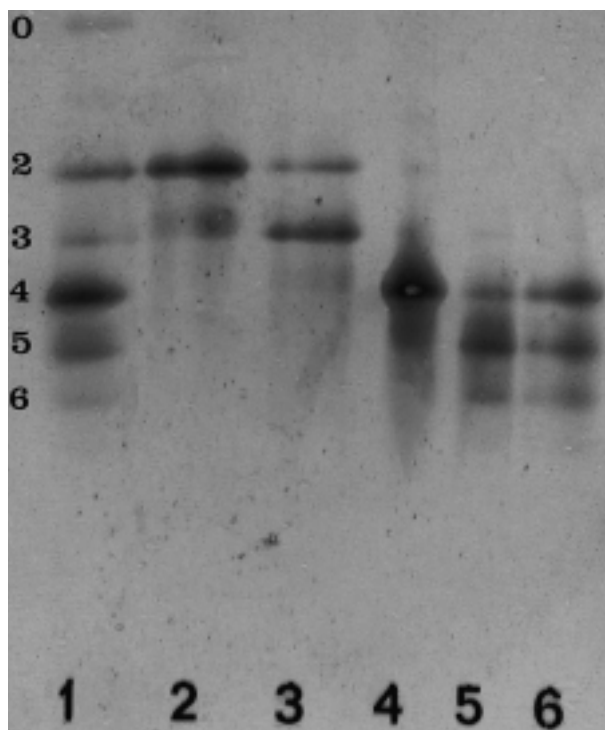
Figuur 4. Het IEF-patroon van de fracties uit figuur 1 (0, 2, 3, 4, en 5 sialo-Tf).

gende 7 tot 25 ml, buffer C 18% tot einde van de run. Pumpsnelheid 3,0 ml/min.

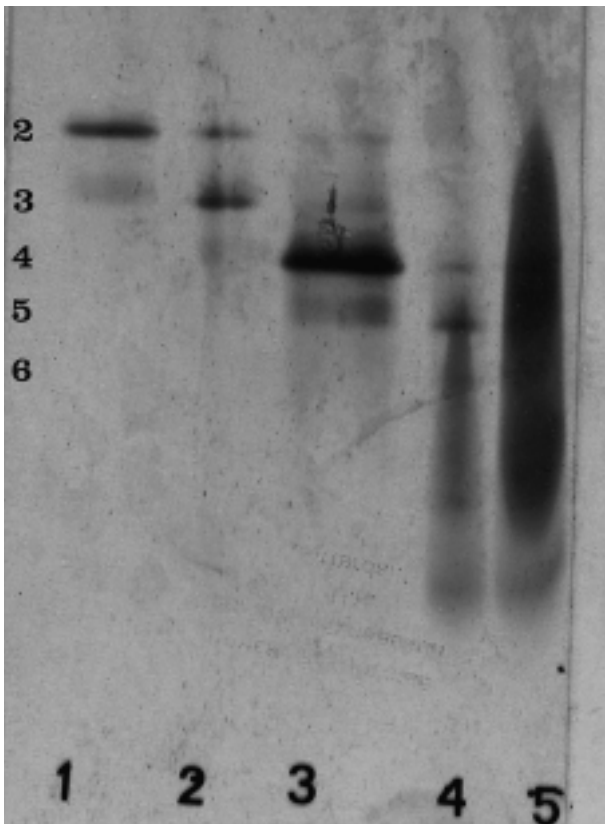
Het 460 nm absorptiesignaal wordt geregistreerd en de relatieve hoeveelheid van elke piek wordt berekend door piek-integratie van het chromatogram.

Tijdens de run worden fracties van 1 ml verzameld. De fracties van de pieken worden geconcentreerd en via de IEF-methode nader bekeken.

De variatie coëfficiënt voor de IEF-methode, voor de geringste fractie bedraagt 15% (n=10) voor de HPLC-methode, eveneens voor de geringste fractie, de 2-sialo-Tf, 25% (n=10).



Figuur 5. Het IEF-patroon van de fracties uit figuur 2. De gel is behandeld met anti-transferrine. Laan 1: normaalserum. Laan 2 en laan 3: resp. di- en tri-sialo. Laan 4: tetrasialo. Laan 5 en laan 6: resp. tetra-, penta- en hexa-sialo-Tf.



Figuur 6. Idem als figuur 5, zonder behandeling met anti-Tf. Duidelijk zijn de niet Tf-eiwitten in laan 4 en 5. Laan 1: di-sialo. Laan 2: di- en tri-sialo. Laan 3: tetra-sialo. Laan 4 + 5: andere eiwitten.

RESULTATEN

In de figuren 1 t/m 3 wordt de chromatografische scheiding met HPLC besproken.

Figuur 1 toont het HPLC chromatogram, een elutiepatroon vs extinctie, van een mengsel van zuiver sialo-transferrinen (0-, 2-, 3-, 4-, 5-sialo-Tf) (5).

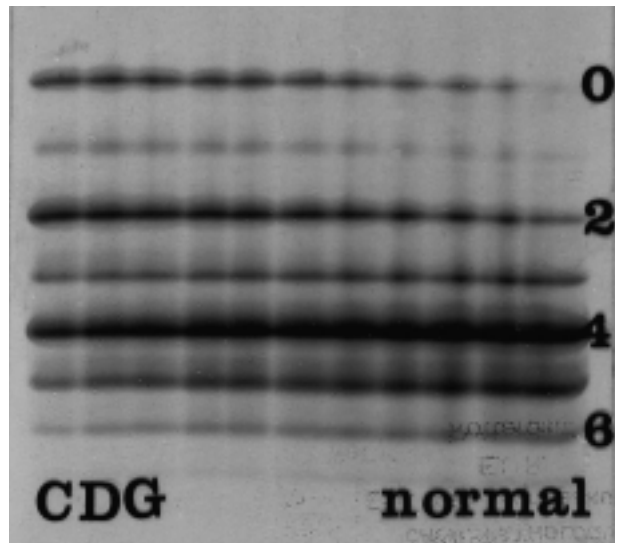
Dit is een goede scheiding die in figuur 4 vergeleken wordt met de IEF-scheiding. Kwantificering zou mogelijk zijn. De HPLC-scheiding is gebruikt voor een indicatie van de plaats van de sialo-Tf in het elutie-diagram.

Figuur 2 en 3 geven de scheiding aan met behulp van HPLC van eenzelfde serum gemeten resp. bij 460 nm (Tf.2Fe) en bij 280 nm (eiwit). Daar zowel bij 460 nm maar vooral bij 280 nm de extinctie van andere dan Tf-eiwitten een rol speelt is kwantificering niet nauwkeurig. Uit het IEF-patroon van figuur 5 en 6 zal blijken dat de fracties uit 2 en 3 niet homogeen zijn.

Figuur 4 laat het scheidingspatroon zien van het mengsel van zuivere sialo-transferrinen via de IEF-methode.

Figuur 5 geeft het IEF-patroon van de sialo-fracties uit figuur 2 (HPLC). Zoals in de procedure beschreven is (6) wordt de gel met anti-transferrine behandeld zodat de sialo-transferrinen precipiteren, gekleurd en gemeten kunnen worden. De overige eiwitten worden uit de gel weggewassen. Blijkens het patroon is de HPLC-scheiding niet optimaal.

Figuur 6 geeft het IEF-patroon van dezelfde fracties



Figuur 7. Het IEF-patroon van mengsels CDG en normaal serum, een verdunningsreeks. Uiterst links 100% CDG serum. Uiterst rechts 100% normaal serum. Daartussen stappen van 10% d.w.z. 90-10, 80-20, etc.

als gebruikt in figuur 5. Nu is de behandeling met anti-transferrine achterwege gelaten. Duidelijk is dat andere eiwitten dan sialo-transferrinen aanwezig zijn. Detectie van sialo-transferrinen met 5-, 6- of 7-sialo-eenheden is onmogelijk vooral door de grote hoeveelheid albumine die na 4-sialo-Tf van de kolom komt en de dikke vlek geeft in laan 4 en 5.

De scheiding van fracties met 0 - 4-sialo-transferrinen is redelijk.

Teneinde na te gaan in hoeverre de IEF-methode betrouwbare uitkomsten geeft over een groot concentratiegebied hebben wij ook verdunningsreeksen geanalyseerd (niet weergegeven) van zuivere fracties, die uit fig. 1 en 4 en van sera.

In figuur 7 en 8 is het één en ander weergegeven. Het serum van een patiënt met CDG type I met verhoogd 0- en 2- en verlaagd 4-sialo-Tf werd verdund met normaal serum in stappen van 10%, d.w.z. geanalyseerd werd 100% CDG, 90% CDG + 10% normaal serum etc. tot 0% CDG en 100% normaal serum.

De resultaten ziet men in figuur 7 en 8. De 0- en 2-sialo-Tf nemen af van 100% CDG naar 100% normaal terwijl de 4-sialo-Tf toeneemt (van links naar rechts in de figuur).

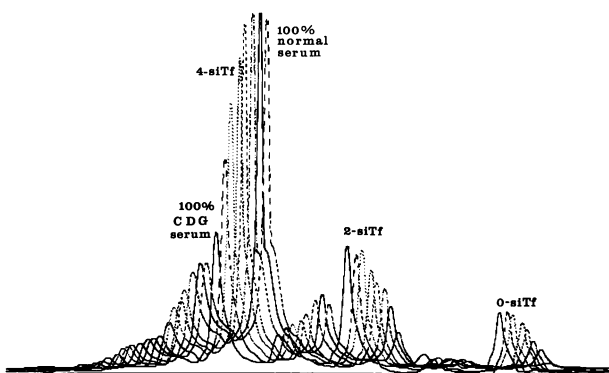
Conclusie

De scheiding van sialo-transferrinen via de IEF-methode op Immobiline gel in het Multipor systeem gevolgd door laser scanning is te prefereren boven die met het HPLC systeem.

Met de IEF-methode is de procentuele hoeveelheid van sialo-transferrinen te bepalen en kan vergeleken worden met waarden voor normaal serum (11).

De kosten (geen arbeidskosten) per serum schatten wij op fl. 7,=.

De boodschap die wij willen brengen is dat de scheiding m.b.v. HPLC van sialo-transferrinen aanwezig in normaal serum van 0-4 sialo-transferrinen redelijk



Figuur 8. Densitometrie van de bandjes uit figuur 7. CDG heeft een relatief lage 4-sialo-Tf en relatief hoge 0- en 2-sialo-Tf. Normaal serum een relatief lage 0 en 2 sialo en een hoge 4 sialo-Tf.

is, maar dat kwantificering niet goed mogelijk is. IEF-patronen van fracties uit het HPLC-chromatogram laten zien dat de fracties niet homogeen zijn. Vandaar onze kwalitatieve benadering in dit artikel.

Literatuur

- Noort WL van, Jong G de, Eijk HG van. Ideale scheiding en kwantificering van sialo-transferrinefracties in humaan serum. *Tijdschr NVKC* 1993; 18: 43-45.
- Stibler H, Borg S, Allgulander C. Clinical significance of abnormal heterogeneity of transferrin in relation to alcohol consumption. *Acta Medica Scand* 1979; 206: 275-281.
- Renner F, Kanitz RD. Quantification of carbohydrate-deficient transferrin by ion-exchange chromatography with an enzymatically prepared calibrator. *Clin Chem* 1997; 43: 485-490.
- Arndt T, Hackler R, Kleine TO, Gressner AM. Validation by isoelectric focussing of the anion exchange isotransferrin fractionation step involved in determination of carbohydrate-deficient transferrin by the CDTest assay. *Clin Chem* 1998; 44:1: 27-34.
- Jong G de, Noort WL van, Eijk HG van. Carbohydrate analysis of transferrin subfractions isolated by preparative isoelectric focussing in immobilized pH gradients. *Electrophoresis* 1992; 13: 225-228.
- Eijk HG van, Noort WL van. The analysis of human serum transferrins with the Phast System: Quantitation of microheterogeneity. *Electrophoresis* 1992; 13: 354-358.
- Cotton F, Adler M, Dumon J, Boeynaems JM, Gulbis B. A simple method for carbohydrate-deficient transferrin measurement in patients with alcohol abuse and hepatogastrintestinal diseases. *Ann Clin Biochem* 1998; 35: 268-273.
- Jong G de, Noort WL van, Eijk HG van. Optimized separation and quantitation of serum and cerebrospinal fluid transferrin subfractions defined by differences in iron saturation or glycan composition. In: *Progress in iron research*. Edited by C. Hershko et al. Plenum Press N.Y., 1994; 51-59.
- Heggli DE, Aurebekk AAGOT, Granum B, Westby C, Lovli T, Sundrehagen E. Should tri-sialo-transferrins be included when calculating carbohydrate-deficient transferrin for diagnosing elevated alcohol intake? *Alcoholism* 1996; 31: 381-384.
- Jaeken J, Eijk HG van, Heul van der C, Corbeel L, Eeckels R, Eggermont E. Sialic acid different serum and cerebrospinal fluid transferrin in a newly recognized genetic syndrome. *Clin Chim Acta* 1984; 144: 245-247.
- Noort WL van, Eijk HG van. Separation of human serum and cerebrospinal fluid transferrins in subfractions by isoelectric focussing with PhastSystem and quantitation with Ultrosan XL densitometer. *Science Tools* 1992; 36: 1-6.
- Schmitt UM, Stieber P, Jüngst D, Bilzer M, Wächtler M, Heberger S, Seidel D. Carbohydrate-deficient transferrin is not a useful marker for the detection of chronic alcohol abuse. *Eur J Clin Invest* 1998; 28: 615-621.