

F. KNÜCHEL (Heidelberg): Färbung, Registrierung und Auswertung von Haptoglobinen, Fermenten und Gesamtproteinen im Serum nach elektrophoretischer Trennung im Stärkegel. (Mit 3 Textabbildungen.)

Seit der Einführung der Stärkegelelektrophorese durch SMITHIES¹ wurden verschiedene methodische Modifikationen empfohlen², durch die entweder eine bessere Auftrennung der Serumproteine oder günstigere Bedingungen für die Trennung anderer Proteingemische (Toxine, Hb-Lösungen usw.) erreicht werden können. Während die elektrophoretische Trennung selbst heute keine wesentlichen Schwierigkeiten mehr bietet, sind die Verfahren zur photometrischen Registrierung und Auswertung analog derjenigen, wie sie nach Elektrophorese auf Papier oder Acetatfolie üblich sind, noch unvollkommen.

Die Erkennung genetisch fixierter Proteineigentümlichkeiten wie die der Haptoglobin- oder Transferrin-Typen gelingt zwar durch direkten Vergleich der Diagramme. Für die Dokumentation lassen sich Photogramme der angefärbten Streifen unter Umständen verwenden. Da sich normale und pathologisch veränderte Proteinspektren aber weniger in qualitativer als in quantitativer Hinsicht ändern, erscheint eine quantitative Auswertbarkeit der Diagramme, insbesondere für klinische Fragestellungen, eine der wesentlichsten Voraussetzungen. Als weitere Bedingung für quantitative Vergleiche ist eine exakte Reproduzierbarkeit der Gelelektrophoresediagramme erforderlich. — Ziel dieser Untersuchungen war es daher, eine Standardmethode zu finden, die ohne großen technischen Aufwand reproduzierbare Trennungen ermöglicht, und Färbeverfahren zu erproben, nach denen eine photometrische Registrierung mit den bei der Papierelektrophorese gebräuchlichen Geräten möglich ist.

Trennkammern. Zweckmäßig für Serumanalysen erwiesen sich Gelstreifen von 14 mm Länge, 20 mm Breite und 6 mm Höhe. Wir benutzen eine Kammer von einer Bodenfläche von 16×16 cm, in der 5 Analysen gleichzeitig durchführbar sind. In einen Schlitz von 2 mm Höhe wird vor Beschickung der Kammer mit dem flüssigen Gel ein Filtrierkartonstreifen (Nr. 2230, Schleicher & Schüll) 20×90 mm für die Stromzufuhr aus den Elektrodengefäßen eingeschoben. Die Stromzufuhr erfolgt jeweils über 2 Paar Elektrodengefäße — ebenfalls aus Plexiglas — 20 cm lang, 5 cm hoch und 4–5 cm breit. In den innen angebrachten Trögen befinden sich die Elektroden in Form eines am Boden durch die ganze Kammer gespannten Platindrahtes. Die Verbindung zwischen innerem und äußerem Trogpaar wird durch Filtrierpapierbrücken hergestellt. Ein Doppelpaar derartiger Elektrodenträge wird mit Puffer A, ein weiteres mit Puffer B etwa 2–3 cm hoch angefüllt.

Puffer A: Tris-Citronensäure, $p_H = 8,9$; Herstellung aus folgenden Stammlösungen:

a) Tris 1,0 M (121, 14 g/Liter);

b) Citronensäure 0,1 M (21,01 g/Liter);

A = 76 ml a + 50 ml b + H₂O ad 1000 ml.

Puffer B: Borsäure — NaOH, pH = 8,5; Herstellung aus folgenden Stammlösungen:

a) Borsäure 0,6 M (37,1 g/Liter);

b) NaOH 1,0 M (Fixanal);

B = 500 ml a + 60 ml b + H₂O ad 1000 ml.

Durch Verwendung dieses von POULIK³ angegebenen Doppelpuffers erhält man eine wesentlich schärfere Trennung als bei Verwendung nur eines Boratpuffers.

Herstellung des Stärkegels. Für 5 Streifen (140 × 20 × 6 mm) werden 150 ml 15%iger Stärke nach SMITHIES (zu beziehen durch Fa. Serva Entwicklungslabor, Heidelberg) in Puffer A suspendiert und im Erlenmeyer-Kolben über offener Flamme unter starkem Bewegen so lange erhitzt, bis die zunächst zähflüssige Konsistenz kurz vor dem Siedepunkt sich in eine weniger zähflüssige verwandelt. Hiernach wird der Kolben unter einer Vakuumpumpe möglichst rasch so lange evakuiert, bis keine wesentliche Schaumbildung mehr erkennbar ist (bei gut saugenden Pumpen etwa 10 sec). Nach Anfeuchten der Verbindungen aus Filtrierkarton mit Puffer A wird das viscöse, völlig klare Gel in die vorher bereitgestellten Kammern gleichmäßig verteilt. Die Oberfläche der Stärke soll hiernach den Rand bzw. die Zwischenwände der Kammer um etwa 2 mm überragen. Nach etwa 1—2 min, sobald die Oberfläche des Gels opalescent wird, werden die Streifen mit Paraffinum liquid. und einer dünnen PVC-Folie dicht abgedeckt und kommen zur weiteren Erstarrung für 2—3 Std in einen Kühlschrank bei +1—2° C.

Auftragen der Serumproben. Nach Abheben der PVC-Folie wird das die seitlichen Trennwände überragende Gel mit einem flach aufliegenden Rasiermesser in Höhe der Kammerseitenwände entfernt. Hierdurch sollen genau 6 mm dicke Gelstreifen mit völlig glatter Ober- und Unterfläche resultieren, was für die spätere optische Analyse ausschlaggebend ist. — Für Routineuntersuchungen genügt die Auftragung des Serums in Filtrierpapier. Hierzu werden aus mittelstarkem, im feuchten Zustand nicht zu weichen, glatten Filtrierpapier Nr. 2214a (Macherey & Nagel) Streifen von der Größe 8 × 16 mm und 6 × 16 mm zurechtgeschnitten. Mit einem Spatel von 16 mm Breite wird in jedem der Gelstreifen 3 cm von einem Ende entfernt ein Spalt vorbereitet, dessen Ränder sich nach Entfernen des Spatels wieder aneinanderlegen sollen. Die zu analysierenden Serumproben werden zunächst der Reihe nach in die vorbereiteten Filtrierpapierblättchen 8 × 16 mm aufgesogen und diese dann in den vorbereiteten Spalt bis auf den Kammerboden eingesteckt. Danach werden die gleichen Seren in die kleineren Filtrierpapierblättchen

aufgesogen, die zuerst in den Spalt verbrachten Streifen entfernt und durch letztere ersetzt. Der obere Rand dieser Papierstreifen soll das Niveau der Gelstreifen nicht überragen.

Elektrophoretische Trennung. Wenn diese auch bei Zimmertemperatur möglich ist, so erhält man doch bessere und vor allem exakter reproduzierbare Ergebnisse, wenn die Trennung bei niedriger Temperatur und hoher Spannung ausgeführt wird. Hierzu werden die den Puffer A und B enthaltenden Elektrodengefäße mit etwa 5% Glycerinzusatz bei -3°C vorgekühlt und bei dieser Temperatur wird auch die Elektrophorese durchgeführt. Die meisten Kühltruhen weisen zu große Temperaturschwankungen auf. Deshalb ist unter Umständen eine zusätzliche Regulierung mit Hg-Kontakt-Thermometer erforderlich. Da die üblichen Hg-Kontaktthermometer mit den entsprechenden Relais aber eine Stromeinschaltung bei einer eingestellten Minimaltemperatur bewirken, muß ein zweites Relais, das durch das erstere gesteuert wird, so angebracht werden, daß bei Erreichen von -2°C Stromeinschaltung und bei -3°C Stromausschaltung des Kühlaggregates erfolgt.

Die Kammer mit den zu trennenden Serumproben wird dann derart auf die Puffertröge aufgelegt, daß die Verbindungsstreifen zum Gel in den Puffer der äußeren Tröge ragen. Bei einer Elektrodenspannung von 500—550 V erfolgt zunächst für die Dauer von 3 Std Trennung in Puffer A. Hierbei soll die Stromstärke, bei einer Temperatur der Kammer von -2°C , bei Streifen von 140 mm Länge, 6 mm Höhe und 20 mm Breite 20 mA, d. h. pro Streifen 4 mA betragen. Bei geringerer Stromstärke erfolgt Unterkühlung des Gels und unter Umständen Schrumpfung; höherer Stromdurchgang führt zu Erwärmung und Quellung. Nach 3stündiger Trennung in Puffer A wird die Kammer über die Elektrodengefäße mit Puffer B — ebenfalls bei -3°C — ausgewechselt, wo eine weitere Trennung für etwa 3 Std bei einem Strom von 30 mA (= 6 mA pro Streifen) erfolgt. Die hierzu erforderliche Anfangsspannung an den Elektroden beträgt 600—700 V, nach etwa 30 min nur noch etwa 500—550 V. Etwa nach 1 Std Laufzeit in Puffer B erkennt man einen sich von der Kathode zur Anode hin fortbewegenden, leicht braun gefärbten, schmalen Streifen, den sog. high-voltage-gradient. Er bewegt sich bei genannter Spannung etwa 35 mm/Std anodenwärts. Er läßt sich besonders deutlich im UV-Licht einer Analysenlampe als stark grau-blau fluoreszierende Linie erkennen und verfolgen. Die Trennung in Puffer B wird zweckmäßigerweise dann beendet, wenn dieser Gradient 10 mm vor dem anodischen Gelende angelangt ist.

Schneiden der Gellamellen. Um eine exakte photometrische Auswertung zu erhalten, muß das 6 mm dicke Stärkegel in 3 Lamellen jeweils 2 mm dick, geschnitten werden. Dies gelingt mit Hilfe eines Hobels, in dem in 2 mm Abstand 2 längs durchgebrochene Rasierklingen übereinander eingespannt sind. Das zu schneidende Gel wird aus der Kammer

herausgehoben, anhaftende Paraffinreste werden mit Filtrierpapier aufgesogen und auf eine Plexiglasgrundplatte zwischen 2 Führungsschienen für den Hobel gelegt. Eine Verformung des Gels während des Schneidens ist zu verhindern. Hierzu wird ein Plexiglasstreifen von etwa 30 cm Länge und 20 mm Breite, an den 5 cm entfernt eine 6 mm dicke Querleiste angebracht ist, mit dieser Leiste gegen die Grundplatte und mit dem freien längeren Ende gegen die Geloberfläche leicht angedrückt. Durch Verschiebung des Hobels mit seinen 2 Schneiden entlang bzw. durch den Gelstreifen entstehen 3 gleich dicke, planparallele Lamellen, in denen die Position der einzelnen Proteinkomponenten übereinstimmt. Diese lassen sich auf verschiedene Weise anfärben und miteinander vergleichen.

Färbungen. Bei der meist angewandten Proteinfärbung mit Amidoschwarz in Methanol-Essigsäure (1 g Amidoschwarz 10 B + 50 ml Methanol + 10 ml Eisessig + 40 ml H_2O) werden die Gelstreifen undurchsichtig und schrumpfen. Letzteres würde zudem auch bei der anschließenden Differenzierung mit Methanol-Wasser-Eisessig (Methanol 50, H_2O 45, Eisessig 5 Teile) erfolgen. Empfehlenswerter ist daher folgende Farblösung: Supracenviolett 3 B 0,4 g, Trichloressigsäure 40 g, H_2O ad 1000. In dieser Farblösung kommt es zur Fixierung und Denaturierung der Proteine und deren progressiver Anfärbung. Sie ist nach etwa 24 Std beendet. Danach erfolgt eine Differenzierung; zunächst für 15 min in 5% HCl, dann in so oft gewechselter 5%iger Essigsäure, bis keine Farbe mehr extrahiert wird. Hierbei bleiben die Streifen so transparent, daß eine photometrische Registrierung mit einem Extinktionsschreiber, analog der von Papierelektrophoresediagrammen, möglich ist.

Zum Nachweis von Haptoglobin (Hp) oder Hämoglobin (Hb) bzw. der Hp-Hb-Verbindungen wird einer der drei 2 mm dicken Gelstreifen in eine frisch bereitete Benzidinlösung folgender Zusammensetzung gelegt: Benzidin 0,2 g + H_2O 100 ml + Eisessig 0,5 ml + H_2O_2 30% 0,2 ml. Hierin färbt sich Hb sowie Hp-Hb innerhalb von 10–20 min dunkel grün-blau, ohne daß in den katalasehaltigen Stellen des Gels O_2 -Blasen frei werden, die die Transparenz stören, und ohne zu raschen Farbumschlag von blaugrün nach braun zu bewirken.

Photometrische Registrierung erfolgt, sobald die Farbintensität ihr Maximum erreicht hat (nach etwa 15 min). Zur Haltbarmachung der durch die Benzidinreaktion entstandenen Farbe werden die Streifen kurz mit Aqua dest. gewaschen, um anhaftendes Benzidin zu entfernen, und dann für 10 min in einer 0,1%igen Nickelammon-Sulfatlösung, anschließend für 12 Std in einer 0,2% Nickelammonsulfatlösung „fixiert“. Hierin ändern die peroxydasepositiven Stellen ihre Farbe von blau-grün nach blau-schwarz. Die Registrierung der Hp-Typen kann auch erst nach Einwirkung von $NiSO_4(NH_4)_2SO_4 + 6H_2O$ erfolgen. Zur photographischen Dokumentation empfiehlt es sich, die Streifen zunächst für 12 Std in 2mal gewechseltes Glycerin zu legen, worin die Transparenz zunimmt

und die angefärbten Stellen, besonders in transparentem Licht, kontrastreicher werden. Eine Fixierung der peroxydasehaltigen Komponenten gelingt auch dadurch, daß die Streifen, sobald die benzidinpositiven Stellen deutlich sind, kurz mit H_2O abgespült und mit Supracenviolett-Lösung übergossen werden. Nach einigen Stunden wird ein Teil des Farbstoffes unlöslich und fällt aus. Auf die Gelstreifen sedimentierter Farbstoff läßt sich mit Wasser abspülen oder durch Bestreichen mit einem weichen Pinsel und gleichzeitiges Spülen entfernen. Die benzidinpositiven Stellen erscheinen hiernach blau-schwarz, die übrigen Proteine klar blau-violett.

Fermentnachweisverfahren. Zum Nachweis von Esterasen, Phosphatasen und Lipasen eignen sich folgende Verfahren: 20 mg α -Naphthylphosphat oder β -Naphthylacetat werden in einigen Milliliter Aceton gelöst. Hierzu werden zum Nachweis von Esterasen und alkalischer Phosphatase 20 ml Tris-Puffer p_H 7,8 und 80 ml H_2O , zum Nachweis von saurer Phosphatase 20 ml Tris-Puffer p_H 4,0 + 80 ml H_2O und vor Gebrauch 100 mg Echtblausalz B oder besser Fast Garnet Salt GBD zugefügt. Die Gelstreifen bleiben bei Zimmertemperatur so lange in dem Reagens, bis die Farbzonen sich deutlich vom sonst farblosen Untergrund abheben; bei Esterasen etwa 30 min, bei Phosphatasen 1—2—12 Std. Zum Nachweis und zur Lokalisation der Lipasen werden die Streifen zunächst für 1 Std bei $37^\circ C$ in eine Lösung von 20 mg β -Naphthyllaurat in Tris-Puffer p_H 7,2 gelegt. Hiernach wird kurz mit Wasser gespült und mit folgender Lösung übergossen: Echtblau B 200 mg, Aluminiumsulfat 200 mg, Zinkchlorid 50 mg, H_2O 100 ml. Vor der Registrierung sollen die Streifen, auch bei Fermentnachweisen, zunächst für mindestens 12 Std in 5% Essigsäure gelegen haben, um ihren Quellungszustand dem nach der Proteinfärbung mit Supracenviolett anzugleichen, damit eine exakte topographische Zuordnung möglich ist.

Registrierung und Auswertung. Die Registrierung kann mit den für Papierelektrophoresen handelsüblichen Extinktionsschreibern vorgenommen werden. Da die einzelnen Protein- bzw. Hp-Komponenten zum Teil als sehr schmale und eng beieinanderliegende Zonen getrennt werden, ist eine ausreichende Trennung der Einzelkomponenten nur bei Verwendung einer Spaltbreite von 0,1 mm und 10—15 mm Spaltlänge möglich. Die quantitative Auswertung kann planimetrisch vorgenommen werden. Als Planimeter bewährte sich der Polarplanimeter der Fa. A. Ott, Kempten, Bayern. Es empfiehlt sich, nur Mittelwerte aus mindestens 10 Messungen jeder Einzelkomponente als Flächenmaß auszuwerten.

Die folgenden Beispiele sollen die Leistungsfähigkeit der Registrierung von Stärkegel-Elektrophoresen demonstrieren. Abb. 1 zeigt oben ein Diagramm eines Normalserums nach der üblichen Trennung in Veronalpuffer auf Papier. Zusatz von 300 mg-% Hb ändert das Diagramm nur unwesentlich, so daß auf die Reproduktion einer Kurve nach Hb-Zusatz

verzichtet wurde. Die Kurven unten sowie die darunter reproduzierten Photogramme zeigen — ausgezogene Linie — das Resultat einer papier-elektrophoretischen Trennung in Tris-EDTA-Borsäure-Puffer nach AARONSSON u. GRÖNWALL und — punktiert — das Diagramm des gleichen Serums nach Hb-Zusatz. Neben einer weitergehenden Auftrennung als im Veronalpuffer ist erkennbar, daß die α_2 -Komponente (Hp) nach Hb-Zusatz zusammen mit einem Teil des Hb zwischen α_3 und β_1 wandert und ein Teil des nichtgebundenen Hb im Bereich von β_3 . Einzelheiten hierüber s. unter 4.

In Abb. 2 ist das Diagramm des gleichen Serums nach Elektrophorese in Stärkegel dargestellt. Die ausgezogene Kurve wurde nach Färbung mit Supracenviolett

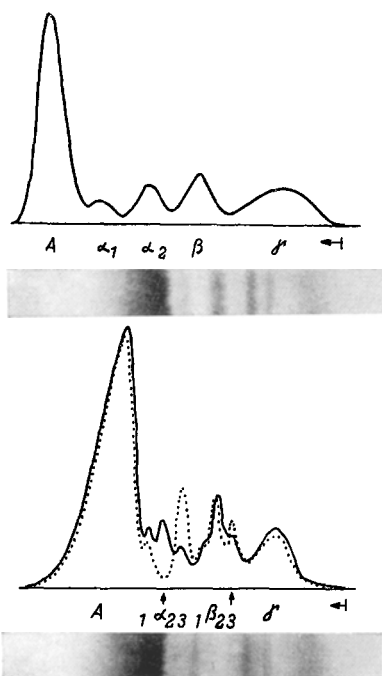


Abb. 1

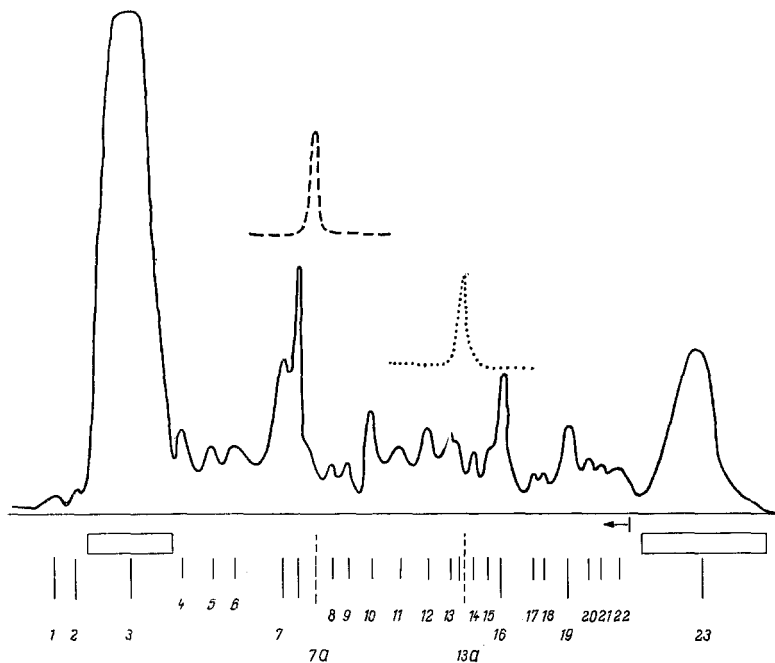


Abb. 2

(Proteine), die punktierte nach Inkubation mit Reagens zum Esterasenachweis, die gestrichelte nach β -Naphthylphosphatzusatz pH 7,8 und 8stündiger Inkubation bei Zimmertemperatur registriert. Dem Serum ist kein Hb zugesetzt, die Hp-Gruppe war 2—2.

Den fortlaufenden Zahlen unter der Abszisse entsprechen folgende Proteinkomponenten eines Serums von Hp-Typ 2—3.

Gruppen-Nr.	Proteinart u. Synonyma
1	Präalbumin 1 = Thyroxinbindendes Protein
2	Präalbumin 2 = saures Mucoprotein = Orsomucoid = α_1 Mucoprotein
3	Albumin
4 } 5 } 6 }	α_2 -Globuline, Coeruloplasmin
7	Transferrin- β -Globuline
7a	alkalische Phosphatase
8 } 9 }	Haptoglobine ?
10 } 11 } 12 }	Haptoglobine
13a	Esterase
14 } 15 }	Haptoglobine
16	α_2 -Globulin = α_2 -Makroglobulin
17 } 18 }	Haptoglobine
19	β_1 -Lipoprotein
20 } 21 } 22 }	Haptoglobine ? Anteile von β Lipoprotein + γ Globulin (Makromolekular)
23	γ -Globulin

Wie sich vor allem bei Seren vom Hp-Typ 1—1 zeigen läßt, entspricht keine der durch Proteinfärbung sichtbar zu machenden Komponente der Stelle mit maximaler Esteraseaktivität, was wahrscheinlich darauf beruht, daß die Fermentmenge zu klein ist, um sich als Protein erkennbar anzufärben. Das gleiche gilt für die sehr langsam wandernden Hp-Hb-Komponenten vom Typ 2—2, die oft nicht als Einzelkomponenten erkennbar sind.

Abb. 3 zeigt 3 Diagramme der Hp-Gruppen 1—1, 2—1 und 2—2 nach Einwirkung von Benzidin-Reagens geschrieben sowie die zugehörigen Photogramme. Die großen Unterschiede des elektrophoretischen Verhaltens der verschiedenen Hp-Arten sind aus dieser Abbildung deutlich zu erkennen.

Da sich nach entsprechender Registrierung eines Hp-Typs das Aufbewahren der Originalstreifen oft erübrigt, bietet die Registrierung erhebliche Vorteile für die Dokumentation.

Fehlerquellen. Artefakte entstehen um so leichter, je weiter die Auftrennung der Serumproteine in Einzelkomponenten erfolgt.

Vor allem ist darauf zu achten, daß möglichst frisches, nichthämo-lytisches Serum verwandt wird, da bereits bei ganz geringfügiger Hämolyse die Haptoglobine als Hb-Hp-Komplexe langsamer wandern. Aus diesem Grunde soll nach vollständiger Gerinnung und bei beginnender Retraktion das Serum von den Formelementen des Blutes getrennt werden. Keineswegs darf Serum von Blut verwandt werden, das vorher im Kühlschrank aufbewahrt wurde.

Zur Bestimmung der Hp-Gruppen sollen einwandfreie, nicht zu alte Hb-Lösungen verarbeitet werden.

Eine in verschlossener Flasche befindliche Hb-Lösung ist bei Aufbewahren bei -2°C etwa 14 Tage verwendbar.

Die Hb-Lösung wird folgendermaßen hergestellt: Citrat- oder Heparinblut wird nach Entnahme sofort zentrifugiert und das Sediment anschließend 6mal mit physiologischer Kochsalzlösung gewaschen. Zum letzten Sediment werden die gleiche Menge Wasser und Toluol zugesetzt und die Mischung etwa 15 min lang geschüttelt. Die Hb-Lösung wird danach abpipettiert, die Hb-Konzentration photometrisch bestimmt und ein Teil derselben zum Gebrauch auf 3,0 g-% mit H_2O verdünnt. Bei der Stärkegel-Elektrophorese soll das Hb homogen sein.

Zu alte Hb-Lösungen ergeben bei elektrophoretischer Trennung oft mehrere Komponenten, von denen

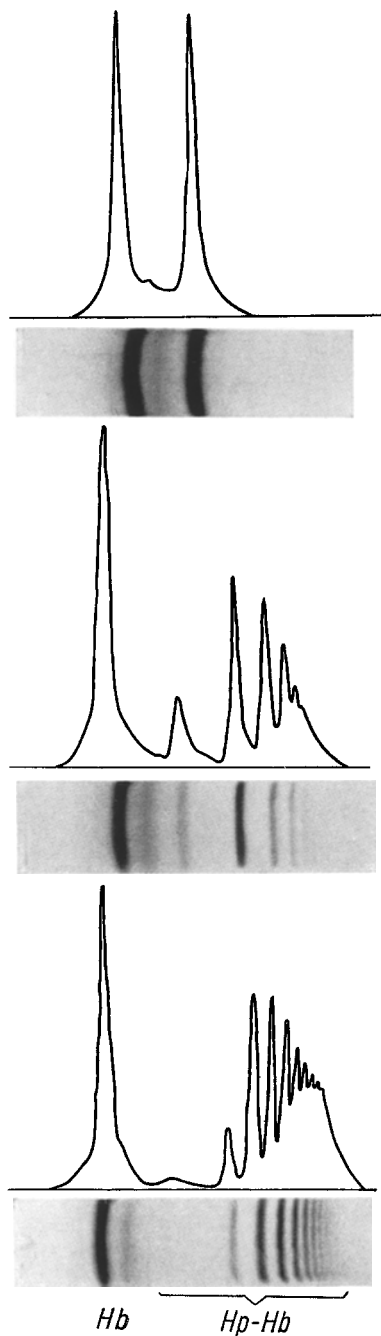


Abb. 3

eine rascher wandert als frisches unzersetztes Hb. Bei der Benzidinreaktion zur Erkennung der Lage von Hb- und den Hb-Hp-Komplexen sind reine Reagentien und frisch hergestellte Lösungen zu verwenden. Die Menge der zugesetzten Essigsäure und die des Perhydrols sollen nicht größer sein als oben angegeben, da sich sonst unter Umständen auch andere Proteinkomponenten unspezifisch mitfärben (Transferrin).

Pathologisch veränderte Seren, vor allem solche von Patienten mit stark beschleunigter BKS, erfordern einen etwas höheren Hb-Zusatz, um das hierbei vermehrte Hp ganz abzusättigen. Falls nach der Benzidinreaktion kein freies Hb erkennbar ist, wird die Untersuchung daher zweckmäßigerweise mit Zusatz von 400 mg-% Hb wiederholt. Atypische Hp-Gruppen können unter Umständen bei Verwendung alter Seren vertauscht werden. Am häufigsten sahen wir eine Doppelung der am raschesten wandernden Hb-Hp-Verbindung bei Typ 2—2, die allerdings auch genetisch bedingt vorkommen kann.

Läßt sich im Serum Erwachsener kein Hp nachweisen, so ist eine Kontrollblutentnahme nach einigen Wochen empfehlenswert, da erfahrungsgemäß völliges Fehlen von Hp als genetisch bedingte Variante extrem selten ist, dagegen bei Lebererkrankungen und Prozessen mit gesteigerter intravasaler Hämolyse relativ häufig erniedrigte Hp-Werte beobachtet werden, die eine echte „Aphaptoglobinämie“ vortäuschen können.

Sind in sonst gut getrennten Seren auffällig wenig Proteinkomponenten zu erkennen, so war meist die aufgetragene Serum- bzw. Proteinmenge zu niedrig. Kontrolle mit größerer Serummenge, eventuell auch vorherige Serumdialyse gegen Dextran oder Periston, führt ebenfalls zu besseren Resultaten.

Schrumpft das Stärkegel während der Elektrophorese, so daß zwischen dem zum Auftragen des Serums benutzten Filterpapier und dem Gel ein Spalt entsteht, der ungleichmäßigen Stromdurchgang bedingt, so sind entweder eine während der Trennung zu niedrige Temperatur, eine zu hohe Konzentration der Stärke, eine nichtausreichende Isolierung gegen Wasserverdunstung oder ein zu lange vorgealtes Gel als Ursache auszuschließen.

Zusammenfassung. Ziel dieser Darlegung war, eine für klinische Zwecke brauchbare und außerdem zur sicheren und relativ einfachen Hp-Gruppen-Bestimmung als zuverlässig erprobte Methode der Stärkegel-Elektrophorese zu empfehlen.

Außerdem wird ein Färbeverfahren geschildert, das die Transparenz des Gels soweit erhält, daß eine photometrische Registrierung sowohl der Proteinkomponenten als auch der durch Farbreaktionen dargestellten Hb-Hp-Verbindungen oder Zonen mit bestimmter Fermentaktivität möglich wird.

Auf die Bedeutung der photometrischen Auswertung zur Dokumentation oder für klinische und forensische Probleme wird hingewiesen.

Literatur

- ¹ SMITHIES, O.: Zone electrophoresis in starch gels: group variations in the serum proteins of normal human adults. *Biochem. J.* **61**, 629—641 (1955).
- ² SMITHIES, O.: Zone electrophoresis in starch gels and its application to studies of serum proteins. *Advanc. Protein Chem.* **14** (1959). Siehe dort auch weitere Literatur.
- ³ POULIK, M. D.: Starch gel electrophoresis in a discontinuous system of buffers. *Nature (Lond.)* **180**, 1477 (1957).
- ⁴ KLEIN, H., u. F. KNÜCHEL: Papierelektrophoretische Bestimmung der Haptoglobingruppen des Menschen. *Deutsche Z. f. gerichtl. Med.* **50**, 278 (1960).

Dr. med. F. KNÜCHEL,

Oberarzt am Sanatorium Königstuhl der LVA Baden in Heidelberg

H. BAITSCH (München): Über Erfahrungen mit der Bestimmungstechnik und der forensischen Brauchbarkeit der Haptoglobintypen nach SMITHIES. (Mit 5 Textabbildungen.)

I.

Die beiden autosomalen Allele Hp^1 und Hp^2 , die nach der Hypothese von SMITHIES und FORD-WALKER den Polymorphismus des Haptoglobin-Systems steuern, unterscheiden sich hinsichtlich des Genprodukts, nämlich des von ihnen synthetisierten Proteins, sehr wahrscheinlich wie folgt: Das Protein, welches in seiner Synthese vom Allel Hp^2 kontrolliert wird, hat die Fähigkeit, höhere Polymere zu bilden, während dem vom Allel Hp^1 kontrollierten Protein diese Fähigkeit fehlt (ALLISON, SMITHIES u. a.).

Der strukturelle Unterschied in der Aminosäuresequenz, der sog. Primärstruktur des Proteins, der beiden Proteintypen ist dabei sehr wahrscheinlich nur ganz geringfügig; von diesen Unterschieden rühren sehr wahrscheinlich die Unterschiede in den Nettoladungen her. Für diese Annahme spricht insbesondere die Tatsache, daß man nicht in der Lage ist, die verschiedenen Haptoglobintypen immunologisch voneinander zu unterscheiden (BEARN und FRANKLIN, FINE und BATTISTINI).

Die übrigen Unterscheidungsmerkmale der Haptoglobintypen dürften im wesentlichen Folgemerkmale darstellen: Die unterschiedliche Hämoglobin-Bindungsfähigkeit der 3 Phänotypen (M. NYMAN) rührt sehr wahrscheinlich daher, daß bei den Haptoglobintypen, bei denen das vom Allel Hp^2 kontrollierte Protein beteiligt ist, Bindungskräfte für den Polymerisationsvorgang besetzt werden (ALLISON, SMITHIES). Die Ultrazentrifugen-Merkmale (und entsprechend natürlich auch die Molekulargewichte) lassen sich zwanglos ebenfalls aus dem Fehlen bzw. dem Vorhandensein des Polymerisationseffektes ableiten (BEARN und FRANKLIN