

Discelektrophoretische Differenzierung saurer Phosphatasen verschiedener Herkunft

PETER HÖHN, GOTFRIED WALTHER und HORST LEITHOFF

Institut für Rechtsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität Mainz (BRD)

Eingegangen am 8. Oktober 1970

Disselectrophoretical Differentiation of Various Acid Phosphatases

Summary. Human seminal fluid contains a very high activity of acid phosphatase. Therefore this enzyme attaches medico-legal importance to the evidence of seminal traces. But this enzyme is present in many other biological fluids—even in a very high activity almost like in human seminal fluid. Comparisons of the qualitative reaction on acid phosphatase gave positive results as well with older human seminal spots as with those of fresh fluids of plant or animal origin.

Disselectrophoretical examinations in polyacrylamide gels evidence the heterogeneity of human acid phosphatase and that of plant or animal origin. The best results of separation were obtained by means of the following conditions:

Spacer gel	2.5% Acrylamid
Separating gel	7.5% Acrylamid
Voltage	180 V, 2.5 mA each tubuli
Time of separating	110 min
Cooling the anode puffer with tap water.	

Under these conditions in the human seminal fluid could be detected 2 zones of enzyme activity. After a storing period of 4 weeks in seminal traces on textile spots appears a 3rd zone between the two bands.

Other investigated biological fluids (plants and snails) showed 3–8 zones of enzyme activity. These bands became unsharp and mixed up after one week of storage. These investigations imply conditional informations in medico-legal experience of seminal traces.

Zusammenfassung. 1. Im menschlichen Ejaculat konnten discelektrophoretisch unabhängig vom Spurenalter konstant 2 Isoenzyme der sauren Phosphatase nachgewiesen werden.

2. Spuren verschiedener Pflanzenpressäfte (Studentenblume, Blumenkohl und Schnecken-schleime — Weinbergschnecke, Schnirkelschnecke —) zeigten 3—8 Isoenzymbanden. Diese Isoenzyme waren in mehr als 7 Tage alten Spuren nicht mehr scharf zu trennen.

3. Die discelektrophoretische Untersuchung der Isoenzyme der sauren Phosphatase bringt für den gerichtsmedizinischen Spermaspuren-nachweis weitere wertvolle Informationen.

Key-Words: Discelektrophorese, Ejaculatuntersuchung — Saure Phosphatase, Nachweis im Ejaculat — Spurenuntersuchung, Sperma — Spermanachweis.

Für den gerichtsmedizinischen Beweis von Spermaspuren ist in erster Linie der mikroskopische Nachweis intakter Samenzellen zu fordern. Da in gewissen Untersuchungsfällen Samenzellen nicht vorhanden sind, kommt auch den übrigen Konstituenten des Ejaculates für die abschließende Diagnose Bedeutung zu. Erwähnt seien der Nachweis von Cholin, Spermin, Zink, spezifischer Proteine

und verschiedener Fermente. Von den Fermenten ist der Nachweis der sauren Phosphatase von großer Bedeutung.

Während man anfangs annahm, daß das Vorhandensein saurer Phosphatase für den Spermanachweis ausreichend sei ([20, 23, 34—36, 50—53, 70] u.a.) übten andere Autoren ([24—26, 39—44, 46, 62, 63, 85] u.a.) aufgrund des Vorkommens dieses Enzyms in vielen biologischen Substanzen Kritik an der Beweiskraft dieser Untersuchungsmethode. So ist die saure Phosphatase unter anderem in Bakterienkulturen [13, 14, 30, 37, 45], Amöben [10], verschiedenen Pflanzensubstanzen [27, 32, 38, 47, 63, 64, 78, 82] und auch in der Milch [9] enthalten. Relativ hohe Aktivitäten weisen dabei Studentenblumen (*Gaillardia magniflora*) und Blumenkohl (*Brassica oleracea* var. *botrytis*) [26, 44] und das Sekret des Fußes der Weinbergschnecke (*Helix pomatia*) [62, 63] auf.

Eine Differenzierung der sauren Phosphatase erfolgte anfangs im Hinblick auf die Substratspezifität und Hemmbarkeit ([1, 2, 15, 28, 81] u.a.). Die ersten Untersuchungen der elektrophoretischen Differenzierung der sauren Sperma- und Prostataphosphatase erbrachten keine verwertbaren Ergebnisse ([11, 12, 16—19, 50, 60, 61] u.a.).

Erst in den letzten Jahren gelang der Nachweis der molekularen Heterogenität der sauren Phosphatase aus der Prostata und Samenflüssigkeit mit Hilfe der Chromatographie, Gelfiltration, Ultrazentrifugation und Immun- und Stärkegelektrophorese [5, 18, 48, 49, 53, 59, 75, 76, 80, 82].

Mit Hilfe discelektrophoretischer Methoden konnte Kaschnitz [33] 4 Typen und Lundin und Allison [48] 13—17 Typen der sauren Prostataphosphatase nachweisen. Ebenso gelang es, die saure Phosphatase tierischer und pflanzlicher Herkunft in Isoenzyme aufzutrennen ([3, 4, 7, 31, 41, 48, 49, 69, 71, 72, 74] u.a.).

In diesem Beitrag soll nachgewiesen werden, daß es möglich ist, die saure Spermaphosphatase und saure Phosphatase tierischer und pflanzlicher Herkunft im frischen Zustand und in Fleckeneluaten discelektrophoretisch zu differenzieren. Aus der großen Anzahl phosphatasehaltiger biologischer Substanzen wurden aufgrund der großen Verbreitung Studentenblume und Blumenkohl sowie das Sekret des Fußes der Weinberg- und Schnirkelschnecke für die Untersuchungen ausgewählt.

Material und Methode

1. Untersuchungsgut

Für die Untersuchung wurde je ein Ejaculat von 14 Spendern, Studentenblume von 15 verschiedenen Standorten, 25 Blumenkohle unterschiedlicher Herkunft, 13 Weinbergschnecken und 14 Schnirkelschnecken unterschiedlicher Fundorte eingesetzt. Die Pflanzenpreßsäfte wurden nach Hauck und Leithoff [26] gewonnen. Die Verarbeitung feuchten Schneckensekretes war nicht möglich. Das Sekret wurde zunächst auf Filterpapier aufgenommen und danach 24 Std bei +4°C mit 2 ml 0,1 M Veronalacetatpuffer pH 7,0 eluiert.

Von den übrigen Untersuchungsmaterialien wurden jeweils 0,1 ml und vom Schnecken schleim etwa 100 mg auf 12,5 cm² große Stücke eines einheitlichen Textilgewebes gegeben. Alle 4 Substanzen wurden frisch, nach einem Tag und weiterhin im Abstand von 7 Tagen bis zur 5. Woche untersucht.

Die Flecke wurden 24 Std bei +4°C mit 2 ml 0,1 M Veronalacetatpuffer pH 7,0 eluiert und vor der discelektrophoretischen Untersuchung 5 min, bei 15000 Umdrehungen/min zentrifugiert. Von dem frischen Untersuchungsgut wurden jeweils 20 µl und von den

Spureneluiten 30 µl, von frischen Spermaflecken auch nur 5—10 µl in die Elektrophoreseröhrchen pipettiert.

2. Elektrophoreseverfahren

Zur Untersuchung wurde die diskontinuierliche Polyacrylamid-Elektrophorese angewandt [29, 57, 58, 64—68, 77, 79]. Zur Untersuchung stand das Gerät der Firma Quickfit und Quarz Ltd. zur Verfügung.

Bei der Zubereitung der Gellsösungen und deren Polymerisation sowie bei der Vorbereitung und Durchführung der Elektrophorese wurden die detaillierten Anweisungen von Davis [15], Williams et al. [84] und Maurer [55] befolgt.

Die Acrylamidkonzentration betrug im Sammelgel 2,5% und im Trenngel 7,5%. Als Elektrodenpuffer wurden wechselweise 0,015 M Acetatpuffer pH 5,6 und Barbital Tris-Puffer pH 7,3 (5,52 g Diäthylbarbitursäure, 1 g Tris-(hydroxymethyl)aminomethan ad 1000 ml Wasser) nach Williams und Reisfeld [84] verwandt.

Die pH-Werte von Sammel- und Trenngel wurden folgendermaßen zusammengestellt:

Trenngel	Sammelgel
pH 5,8	pH 7,3
pH 7,5	pH 5,5
pH 9,0	pH 6,7
pH 10,0	pH 6,7

Die Dauer der Elektrophorese betrug bei allen Versuchen 110 min bei einer Klemmenspannung von 180 V und einer Stromstärke von 2,5 mA pro Röhrchen. Um die Bildung von Hitzblasen im Gel zu Verhindern, wurde der Anodenpuffer mit Wasser von 13°C gekühlt.

3. Der Phosphatasenachweis im Gel

Nach Beendigung der Elektrophorese wurde das Trenngel 30 min in einen 0,1 M Acetatpuffer pH 4,9 eingelegt, um das pH-Optimum der sauren Phosphatase zu erreichen. Die Lokalisierung des Enzyms erfolgt durch Inkubation entweder mit einer 0,00378 M Lösung von Na-1-naphthylphosphat und einer 0,2% Lösung von Variaminblausalz B in 0,05 M Acetatpuffer pH 5,0 oder mit einer 0,00378 M Lösung von Na-1-naphthylphosphat und einer 0,2% Lösung von Fast Garnet GBC Salt in 0,05 M Veronalacetatpuffer pH 5,0 (Barka und Anderson [6], Alleen und Gockermann [3], Grog und Pearse [22]). Die Inkubationsdauer betrug bei 4°C je nach Fermentaktivität zwischen 10 min (frisches menschliches Ejaculat) und 24 Std (einige Wochen alte Blumenkohl- und Malerblumenspuren). Da Fast Garnet GBC Salt wesentlich schneller mit Naphtol — dem Spaltungsprodukt von Na-1-naphthylphosphat — reagierte als Variaminblausalz B, wurde ersteres beim Vorliegen hoher Aktivitäten und letzteres bei niedrigeren Phosphatasewerten angewandt.

4. Vergleichende Untersuchungen über den Ausfall der Bergschen Phosphatasereaktion

Parallel zu diesen Untersuchungen wurden die Spurenflecke einschließlich des Spurenträgers mit dem Phosphatasereagens nach Berg [8] übersprührt.

Ergebnisse

I. Bedingungen der Trennung und Inkubation

Vorversuche ergaben, daß die Bedingungen der Elektrophorese und Enzyminkubation dem Alter und der Art des Spurenmaterials angepaßt werden müssen. Es ergaben sich folgende optimale Bedingungen:

1. Für Spermaspuren

Elektrophorese-Bedingungen. Elektrodenpuffer: 0,015 M Essigsäure/Acetatpuffer pH 5,6; Sammelgelpuffer: Tris/HCl pH 5,5; Trenngelpuffer: Tris/HCl pH 7,5.

Inkubation. Frische Spermaspuren mit Variaminblausalz B 10—30 min; 1—4 Wochen alte Spuren mit gleichem Azokuppler 8 Std; 5 Wochen alte Spuren Fast Garnet GBC Salt 2 Std.

2. Übrige Spuren

Elektrophoreseverfahren. Elektrodenpuffer: Barbital/Tris-Puffer (112) pH 7,3, Sammelgelpuffer: Tris/HCl pH 5,5; Trenngelpuffer: Tris/HCl pH 7,5.

Inkubation. Frische Spuren mit Fast Garnet GBC Salt 10—40 min. 3 Wochen alte Spuren mit gleichem Azokuppler 2—3 Std, 5 Wochen alte Spuren bei gleichem Azokuppler bis zu 12 Std.

II. Ergebnisse der Elektrophoresen

1. Spermaspuren

Bei den insgesamt 190 durchgeföhrten Einzelektrophoresen waren konstant 2 Isoenzymbanden nachzuweisen, wovon die anodenseitige etwas stärker ausfiel (Abb. 1a). Bei über 4 Wochen alten Spuren trat in einigen Fällen zwischen diesen beiden eine dritte Bande auf (Abb. 1b).

2. Preßsaft der Studentenblume

Bei frischen Spuren und 10 min Inkubation waren 4 kathodenständige Isoenzymbanden zu erkennen (Abb. 2a). Nach weiteren 30—60 min traten 3 weitere anodenständige Banden auf (Abb. 2b). Ab einem Spurenalter von 7 Tagen begannen die Banden zu verwischen und waren ab der 3. Woche praktisch nicht mehr zu differenzieren.

3. Preßsaft der Blumenkohle

Bei frischen Spuren und 10 min Inkubation waren 2 kathodenständige (Abb. 3a) und nach weiterer 50minütiger Inkubation 4—6 anodenständige Banden (Abb. 3b) zu differenzieren. Auch diese Banden waren ab einem Spurenalter von 7 Tagen verwischt und ab der 2. Woche kaum noch zu differenzieren.

4. Sekret der Weinbergschnecke

Bei frischen Spuren waren je nach Individuum 3 und 5 Isoenzymbanden (Abb. 4) vorhanden, die ab einem Spurenalter von 1 Woche unscharf wurden und ab einem Alter von 2 Wochen praktisch nicht mehr zu differenzieren waren.

5. Sekret der Schnirkelschnecke

Bei frischen Spuren waren je nach Individuum 4 und 5 Isoenzyme (Abb. 5) nachweisbar. Auch diese Banden zeigten ab einem Spurenalter von 1 Woche eine Unschärfe und waren ab der 2. Woche praktisch nicht mehr zu differenzieren.

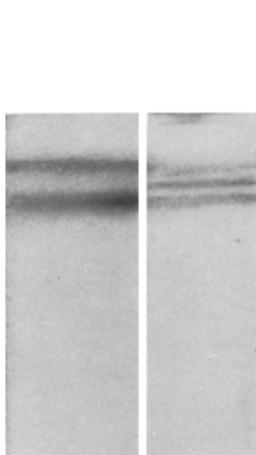


Abb. 1a u. b

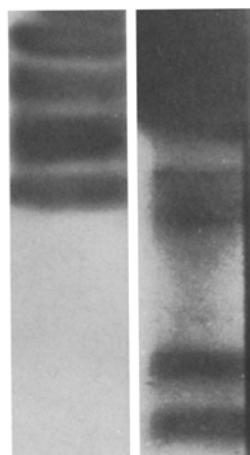


Abb. 2a u. b

Abb. 1a u. b. Isoenzyme der sauren Spermaphosphatase. a 2 Isoenzymbanden in bis zu 4 Wochen alten Spuren. b 3 Isoenzymbanden in einigen Fällen nach Lagerung über 4 Wochen

Abb. 2a u. b. Isoenzyme der sauren Phosphatase der Studentenblume. a 4 Isoenzymbanden nach 10 min Inkubation. b 3 weitere Banden nach 30—60 min Inkubation

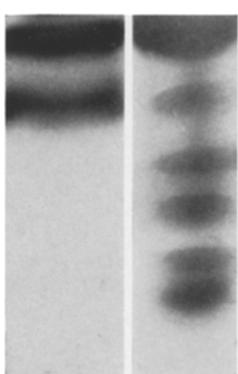


Abb. 3a u. b

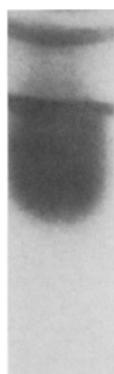


Abb. 4



Abb. 5

Abb. 3a u. b. Isoenzyme der sauren Phosphatase des Blumenkohles. a 2 Isoenzymbanden nach 10 min Inkubation. b 5 weitere Banden nach 50 min Inkubation

Abb. 4. Isoenzyme der sauren Phosphatase der Weinbergschnecke. 2 Banden sind abgrenzbar. Der Rest der Aktivität bildet einen größeren Fleck, der nicht weiter zu differenzieren war

Abb. 5. Isoenzyme der sauren Phosphatase der Schnirkelschnecke. Es lassen sich 3 Banden gut abtrennen. Der Rest der Aktivität lässt sich nicht weiter differenzieren

6. Vergleiche der Bergschen Phosphatasereaktion

Bei frischen Spermaflecken zeigte sich eine starke positive Reaktion. 4 bis 5 Wochen alte Spermaspuren und frische angetrocknete Spuren der Pflanzenpreßsäfte und Schneekenschleime zeigten eine deutlich schwächere Reaktion, waren aber nicht mehr zu differenzieren.

Diskussion

Die Untersuchungen haben gezeigt, daß mit Hilfe der Discelektrophorese im menschlichen Ejaculat 2 Isoenzyme der sauren Phosphatase nachweisbar sind. Diese Isoenzyme sind im eingetrockneten Zustand bis zu 5 Wochen, vermutlich noch länger, stabil. Allerdings gibt es noch 2 weitere instabile Isoenzyme (Meisenzahl), die mit dieser hier angewandten Methodik nicht erfaßt wurden. Besonders hervorzuheben ist, daß stets 2 Isoenzyme bei den insgesamt 190 Einzelelektrophoresen nachzuweisen waren.

In den weiteren Untersuchungsmaterialien fanden sich je nach Herkunft 3 und mehr Isoenzyme, die schon nach kurzer Eintrocknungszeit im Gegensatz zu Spermaspuren nicht mehr voneinander zu trennen waren. Auch war die Anzahl der Banden innerhalb jeder Materialgruppe nicht konstant.

Die Vorteile dieser analytischen Mikromethode beruhen auf dem hohen Trennvermögen der Discelektrophorese, die noch Trennungen im Nano- und Pikogrammbereich zuläßt (Matioli). So genügt die äußerst geringe Schleimmenge, die eine Schnecke nach einmaligem Kriechen über ein Filtrierpapier hinterläßt, um verwertbare Isoenzymmuster zu erhalten.

Werden in solchen Fällen zur Spurendiagnose dagegen Methoden angewandt, die nur auf einem quantitativen oder qualitativen Phosphatasenachweis beruhen, so kann aufgrund der relativ geringen Phosphataseaktivität keine Aussage über die Natur der Spur gemacht werden. Entsprechende Versuche mit dem Bergschen Phosphatasereagens zeigten, daß es nicht möglich ist, einige Wochen alte Spermaflecken und einige Tage alten Pflanzenpreßsaft und Schneckenschleimspuren zu differenzieren.

Aus dem hohen Trennvermögen in Verbindung mit der benötigten geringen Substanzmenge ergibt sich, daß im Gegensatz zur Immunodiffusion und Immunelektrophorese die Eluate nicht mehr eingeengt werden müssen. Weiterhin ist von Bedeutung, daß die Elektropherogramme zur Beweissicherung in 7%iger Essigsäure einige Monate und im getrockneten Zustand bis zu 2 Jahren [21] aufbewahrt werden können. Weitere Vorteile dieser Methode sind der relativ einfache apporative Aufwand und die kurzen Trennzeiten.

Die Untersuchungen haben gezeigt, daß eine Abgrenzung der sauren Phosphatase des menschlichen Ejaculates von anderen Phosphatasen möglich ist. Diese Methode allein kann jedoch den Beweis einer menschlichen Ejaculatspur nicht erbringen. Sie ergibt aber in besonders gelagerten Fällen weitere wertvolle Informationen, wie bereits gezeigt werden konnte [83].

Literatur

1. Abdul-Fadl, M. A. M., King, E. J.: The inhibition of acid phosphatase by D-tartrate. *Biochem. J.* **42**, 28 (1948).
2. — — Properties of the acid phosphatase of erythrocytes and of human prostate gland. *Biochem. J.* **45**, 51 (1949).
3. Alleen, M., Gockermann, J.: Electrophoretic separation of multiple forms of particle associated acid phosphatase. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **121**, 616 (1964).
4. Anderson, P. J., Song, S. K., Christoff, N. Y.: The cytochemistry of acid phosphatase in neural tissue. *Proc. 4th Intern. Congr. Neuropathol.*, p. 75. München 1962.
5. Angeletti, P., Moore, B., Suntzeff, V., Gayle, R.: Prostatic fraction of acid phosphatase in human serum. *Proc. Soc. exp. Biol. (N. Y.)* **108**, 53 (1961).

6. Barka, D., Anderson, P.: Histochemistry. Theory, practice and bibliography. New York: Harper & Row 1965.
7. Barron, K. D., Bernsohn, J., Hess, A. R.: Zymograms of neural acid phosphatases implications for slide histochemistry. *J. Histochem. Cytochem.* **12**, 42 (1964).
8. Berg, S.: Eine neue Methode zum Nachweis von Spermaflecken. *Int. kriminalpol. Rev.* **10**, 53 (1955).
9. Bingham, G. W., Jasiewicz, L., Zittle, C. A.: Acid phosphatase in cream and skim milk. *Science* **44**, 1247 (1961).
10. Birns, M.: The localization of acid phosphatase activity in ameba. *Exp. Cell Res.* **20**, 202 (1960).
11. Boman, H. G.: Chromatographie der sauren Prostata Phosphatase. *Biochim. biophys. Acta (Amst.)* **16**, 245 (1955).
12. — Purification of prostatic acid phosphatase. *Ark. Kemi* **12**, 453 (1958).
13. Cannon, F. D., Hawn, C. V. Z.: Phosphatase activity of *Staphylococcus aureus*. *J. Bact.* **86**, 1052 (1963).
14. McCarthy, B. J., Hinshelwood, C.: The phosphatase activity of *Bacterium lactis aerogenes*. *Proc. roy. Soc. B* **150**, 474 (1959).
15. Davies, D. R.: The phosphatase activity of spleen extracts. *Biochem. J.* **28**, 529 (1934).
16. Estborn, B.: Visualization of acid and alkaline phosphatase after starch gel-electrophoresis of seminal (plasma) serum. *Nature (Lond.)* **184**, 1636 (1959).
17. — Localization of prostatic serum acid phosphatase by starch gel-electrophoresis. *Clin. chim. Acta* **6**, 22 (1961).
18. — Separation of phosphatase isoenzymes by gelfiltration. *Z. klin. Chem.* **2**, 53 (1964).
19. — Swedin, B.: Localization of acid phosphatase by starch gel-electrophoresis of fractionally collected human semen. *Scand. J. clin. Lab. Invest.* **11**, 235 (1959).
20. Fisher, R. S.: Acid phosphatase tests as evidence of rape. *New Engl. J. Med.* **240**, 738 (1949).
21. Gabl, F., Pastner, D.: Zur Polyacrylamidgel Elektrophorese: Eine einfache Technik zur Herstellung von Dauerpräparaten. *Clin. chim. Acta* **13**, 753 (1966).
22. Grog, E., Pearse, A. G. E.: A critical study of histochemical techniques for acid phosphatases. *J. Path. Bact.* **64**, 627 (1952).
23. Hansen, P. F.: Determination of the prostata acid phosphatase as a new method for medico-legal demonstrations of spermaspots. *Acta path. microbiol. scand.* **23**, 187 (1946).
24. Hauck, G., Karle, L., Leithoff, H.: Beitrag zur Kenntnis der Phosphatase im Ejakulat von Haustieren. *Zuchthygiene* **3**, 144 (1959).
25. — Leithoff, H.: Phosphatasebestimmung als gerichtsmedizinischer Spermanachweis. *Dtsch. Z. ges. gerichtl. Med.* **49**, 5 (1959).
26. — Beobachtungen über das Vorkommen von Phosphatasen in Gartenpflanzen. *Dtsch. Apoth.-Ztg.* **99**, 351 (1959).
27. Heinicke, R. M.: Pineapple stem acid phosphatase. *Food Res.* **26**, 52 (1961).
28. Herbert, F. K.: Differentiation between prostatic phosphatase and other acid phosphatases in pathological human sera. *Biochem. J.* **38**, 23 (1944).
29. Hjerten, S., Jerstedt, S., Tiselius, A.: Some aspects of the use of continuous and discontinuous buffer system in polyacrylamide gel electrophoresis. *Ann. Biochem.* **11**, 219 (1965).
30. Holsten, B. v., Porath, J.: Purification of some properties of an acid phosphatase from *Escherichia Coli*. *Biochim. biophys. Acta (Amst.)* **64**, 1 (1962).
31. Hunter, R. L., Burstone, M. S.: The zymogram as a tool for the characterization of enzyme substrat specificity. *J. Histochem. Cytochem.* **8**, 58 (1960).
32. Joyce, B. K., Grisolia, S.: Purification and properties of a nonspecific acid phosphatase from wheat and germ. *J. biol. Chem.* **235**, 2278 (1960).
33. Kaschnitz, R.: Disk-Elektrophoretische Trennung von Isoenzymen der sauren Prostata-phosphatase. *Z. klin. Chem.* **1**, 126 (1967).
34. Kaye, S.: The acid phosphatase test of seminal stains, *Amer. J. Pol. Sci.* (in *J. Crim. Law Criminol.*) **41**, 834 (1951).

35. Kaye, S.: Acid phosphatase test for identification of seminal stains. *J. Lab. clin. Med.* **34**, 738 (1948).
36. — Identification of seminal stains. *J. Crim. Law Criminol.* **38**, 79 (1947).
37. Kedna, W.: The phosphatase activity of coagulase-positive staphylococcus aureus strains isolated from patients and healthy persons. *J. Path. Bact.* **85**, 528 (1963).
38. Kuenzler, E. J., Peiras, J. P.: Phosphatase of marine algae. *Biol. Bull. Marine Biol. Lab. Woods Hole* **128**, 271 (1965).
39. Leithoff, H.: Neue Methoden der gerichtsmedizinischen Untersuchung von Spermaflecken. *Fortschr. Med.* **82**, 493 (1964).
40. — L'immuno-électrophorèse et le system analytique microlitre de sang comme méthode auxiliaires d'examen des taches de sang et des taches de sperme. XXIXe Congrès international de langue franç., de médecine sociale, Marseille, 11.—13. Dec. 1962.
41. — Der gerichtsmedizinische Spermanachweis. *Habilitationsschrift Med. Fakultät Freiburg* 1962.
42. — Leithoff, I.: Neue Ergebnisse immunoelectrophoretischer Untersuchungen des menschlichen Samenplasmas. *Med. Welt* **1962**I, 181.
43. — Verteilung der sauren Phosphatase und der Spermien im Spermafleck. Vortrag V. Kongr. internat. Akad. gerichtl. soz. Med. Wien, S. 986 (1961).
44. — Kuzias, G.: Über den Beweiswert des Nachweises sauer Phosphatase bei der forensischen Spermauntersuchung. *Dtsch. Z. ges. gerichtl. Med.* **46**, 260 (1957).
45. McLellan, M. L., Campen, J. O.: The acid phosphatase of yeast localization and secretion by protoplasts. *Biochim. biophys. Acta (Amst.)* **67**, 324 (1963).
46. Lietz, S. Th.: Untersuchungen über den qualitativen Nachweis der sauren Phosphatase in Spermaflecken. *Diss. Med. Fak. Bonn* 1954.
47. Lora-Tomayo, M.: Spécificité de la phosphatase acide de pomme de terre et son inhibition par des composés organophosphoriques. *Bull. Soc. Chim. biol. (Paris)* **20**, 502 (1962).
48. Lundin, L. G., Allison, A. C.: Acid phosphatase from different organs and animal forms. Compared by starch-gel electrophoresis. *Acta chem. scand.* **20**, 2579 (1966).
49. — Acid phosphatase from different organs and animal forms compared by starch-gel electrophoresis. *Biochim. biophys. Acta (Amst.)* **127**, 527 (1966).
50. Lundquist, F., Thorsteinsson, Th., Buns, O.: Purification and properties of some enzymes in human seminal plasma. *Biochem. J.* **59**, 69 (1955).
51. — Medico-legal identification of seminal stains using the acid phosphatase test. *Arch. Path.* **50**, 395 (1950).
52. — Aspects of the biochemistry of human semen. *Acta physiol. scand.* **66**, 1 (1949).
53. — Forensickpaavisning of Sperma og Spermapletter. *Nord. Med.* **28**, 2131 (1945).
54. Matiolo, G. T., Niewisch, H. B.: Electrophoresis of hemoglobin in single erythrocytes. *Science* **150**, 1824 (1965).
55. Maurer, H. R.: Disk-Elektrophorese. Theorie und Praxis der diskontinuierlichen Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese. Berlin: de Gruyter 1968.
56. Meisenzahl, H.: Zur Frage der aktiven Gruppe der humanen Prostata- und Seminalplasmaphosphatase. *Diss. Nat. Fak., Mainz* 1971.
57. Ornstein, L.: Disc-electrophoresis. I. Background and theory. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **121**, 321 (1964).
58. Oster, G. K., Oster, G., Prati, G.: Dye-sensitized photopolymerization of acrylamide. *J. Amer. chem. Soc.* **79**, 595 (1957).
59. Ostrowski, W., Rybarska, E.: Studies on human prostatic acid phosphomonoesterase. Further purification and molecular weight of enzyme. *Biochim. biophys. Acta (Amst.)* **165**, 196 (1969).
60. — Studies on the human prostatic acid phosphomonoesterase. Influence of peptidase and urea on the enzymic activity. *Bull. Acad. Pol.* **21**, 271 (1963).
61. — Tsugita, A.: Purification of acid phosphomonoesterase from human prostate gland. *Biochim. biophys. Acta (Amst.)* **94**, 68 (1961).
62. Prokop, P.: Saure Phosphatase im Sekret von *Helix pomatia* (Weinbergschnecke). *Forum Kriminol.* **3**, 33 (1966).
63. — Forensische Medizin, 2. Aufl. Jena: Fischer 1968.

64. Pouli, M. D.: Starch gel electrophoresis in a discontinuous system of buffers. *Nature (Lond.)* **180**, 1477 (1957).
65. Poulik, M. D., Smithies, O.: Comparison and combination of the starch gel and filter-paper electrophoretic methods applied to human sera: Two dimensional electrophoresis. *Biochem. J.* **68**, 636 (1958).
66. Raymond, S.: Acrylamide gel electrophoresis. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **121**, 350 (1964).
67. — Weintraub, L.: Acrylamide gel as a supporting medium for zone electrophoresis. *Science* **130**, 711 (1959).
68. Reisfeld, R. A., Lewis, U. J., Williams, D. E.: Disc-electrophoresis of basic proteins and peptides on polyacrylamide gel. *Nature (Lond.)* **195**, 281 (1962).
69. Reith, A., Schmidt, W., Schmidt, E.: Über die Isoenzyme der sauren Phosphatase und ihre intracelluläre Lokalisation in der menschlichen und in der Rattenleber. *Klin. Wschr.* **42**, 915 (1964).
70. Riisfeld, O.: Acid phosphatase employed as a new method of demonstrating seminal spots in forensic medicine. *Acta path. microbiol. scand.* **58**, 1 (1946).
71. Schormüller, J., Pfrogner, N., Belitz, H.-D.: Über die pflanzliche Phosphatase II-II. *Z. Lebensmitt. Untersuch.* **127**, 57 (1965).
72. — — — Über die pflanzliche Phosphatase II. Mitteilung. *Z. Lebensmitt.-Untersuch.* **127**, 325 (1965).
73. Schwarz, G., Ludwig, J., Fricker, A.: Über einige Beobachtungen bei der Phosphatasebestimmung in Milch. *Die Nahrung, Chemie, Physiologie, Technology* **6**, 688 (1962).
74. Shibko, S., Tappel, A. L.: Acid phosphatase of the lysosomal and soluble fraction of rat liver. *Biochim. biophys. Acta (Amst.)* **73**, 76 (1963).
75. Shulman, S., Ferber, J. M.: Multiple forms of prostatic acid phosphatase. *J. Reprod. Fertil.* **2**, 295 (1966).
76. Smith, J. K., Whitby, L. G.: The heterogeneity of prostatic acid phosphatase. *Biochim. biophys. Acta (Amst.)* **151**, 607 (1968).
77. Smithies, O.: Zone electrophoresis in starch gel: Group variations in the serum proteins of normal human adults. *Biochem. J.* **61**, 629 (1955).
78. Stables, R. C., McCarthy, W. C., Stahmann, M. A.: Heat stabilities of acid phosphatase from Pinto-bean-leaves. *Science* **149**, 1248 (1965).
79. Steward, F. C., Barber, J. T.: The use of acrylamide gel electrophoresis in the investigation of the soluble proteins of plants. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **121**, 525 (1964).
80. Sur, B. K., Moss, D. W., King, E. J.: Apparent heterogeneity of prostatic acid phosphatase. *Biochem. J.* **84**, 55 (1962).
81. Tsuboi, K. K., Hudson, P. B.: Acid phosphatase III. *Arch. Biochem.* **55**, 191 (1955).
82. Vernon, K. K., Gauldie, J., Hanson, J. M.: Acid phosphatase. *Nature (Lond.)* **208**, 382 (1965).
83. Walther, G., Höhn, P.: Ein besonderer Fall einer Spermafleckenuntersuchung. *Arch. Kriminol.* **145**, 106 (1970).
84. Williams, D., Williams, E., Reisfeld, R. A.: Disc-electrophoresis in polyacrylamide gels: Extension to new condition of pH and buffer. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **121**, 373 (1964).
85. Weyrich, G.: Spermanachweis. *Arch. Kriminol.* **118**, 154 (1956).

Dr. med. P. Höhn
Institut für Rechtsmedizin
D-6500 Mainz
Langenbeckstr. 1, Bau 18