

Originalarbeiten / Original Works

Zur ACP-Typendifferenzierung aus Blutflecken

Nachweisgrenzen und Temperaturabhängigkeit

Bernd Brinkmann und Jürgen Bruns

Institut für Rechtsmedizin der Universität Hamburg, Butenfeld 34, D-2000 Hamburg 54,
Bundesrepublik Deutschland

Typing ACP Isoenzymes in Blood Stains

Testlimits and Temperature Dependancy

Summary. Two series of test blood stains of known red-cell acid phosphatase types A, AB, AC, B, BC, and C are applied to two different types of stain carriers (glass and cotton) and stored at different temperature ranges: (a) 37°C at high air humidity, (b) 22°C, (c) 4°C, and (d) –20°C. Electrophoresis is carried out either on cellulose-acetate-foils or on thin agarose layers. Visualisation of the isoenzyme sites is achieved using umbelliferyl phosphate as a substrate. The most important results are: Electrophoresis on "Cellogel"-foils turns out advantageous compared to agarose since (a) less stain material is required, (b) reproducibility is rather reliable, and (c) electrophoretic separation is clearer. Blood stains on glass are identified after longer periods of storage than stains on cotton. If stains are stored at room temperature the time limits of demonstration are in the range of 3 to 6 weeks. The size of the sample necessary for demonstrating varies widely. Approximately twenty to twenty-five per cent of a blood drop are needed. The method described is recommended as practicable and reliable.

Key words: Blood stains, ACP-ACP isoenzymes in blood stains

Zusammenfassung. Serien von frisch angelegten Blutspuren auf Glas und auf Baumwolle — alle sechs Phänotypen der sauren Erythrocytenphosphatase (acP) — werden verschiedenen Lagerungsbedingungen ausgesetzt: 37°C, hohe Luftfeuchtigkeit; 20°C, Raumtemperatur; 4°C, Kühlschrank; –20°C, Tiefkühlschrank. Die elektrophoretische Darstellung erfolgt parallel mit Hilfe der „Cellogel“-Elektrophorese sowie mit Hilfe der Agarose-Dünnenschicht-Elektrophorese. Die Darstellung der Isoenzyme erfolgt mit Hilfe des fluorogenen Substrats 4-Methyl-Umbelliferylphosphat.

Die wichtigsten Ergebnisse sind: Es werden zur acP-Typendifferenzierung nur Bruchteile eines Blutstropfens verwendet. Die Verwendung der „Cellogel“-Technik ermöglicht a) geringen Spurensubstanzerbrauch, b) sichere Typendifferenzierung, c) längere Nachweisgrenzen (im Vergleich zur Agarose-Technik). Spuren auf Glas lassen sich länger nachweisen als Stoffspuren. Die

ACP=englische Abkürzung für Acid Phosphatase

ungefähren zeitlichen Nachweisgrenzen sind: Bei feuchtwärmer Lagerung 0,5 Wochen, bei Raumtemperaturlagerung 4 bis 6 Wochen, bei Kühlschranklagerung 10 bis 12 Wochen, bei Tiefkühlschranklagerung 13 Wochen.

Die Methode der acP-Typendifferenzierung aus Blutspuren unter Verwendung der „Cellogel“-Technik und des fluorogenen Substrats wird als praktikable und reproduzierbare Methode empfohlen.

Schlüsselwörter: Saure Erythrocytenphosphatase, Blutspuren

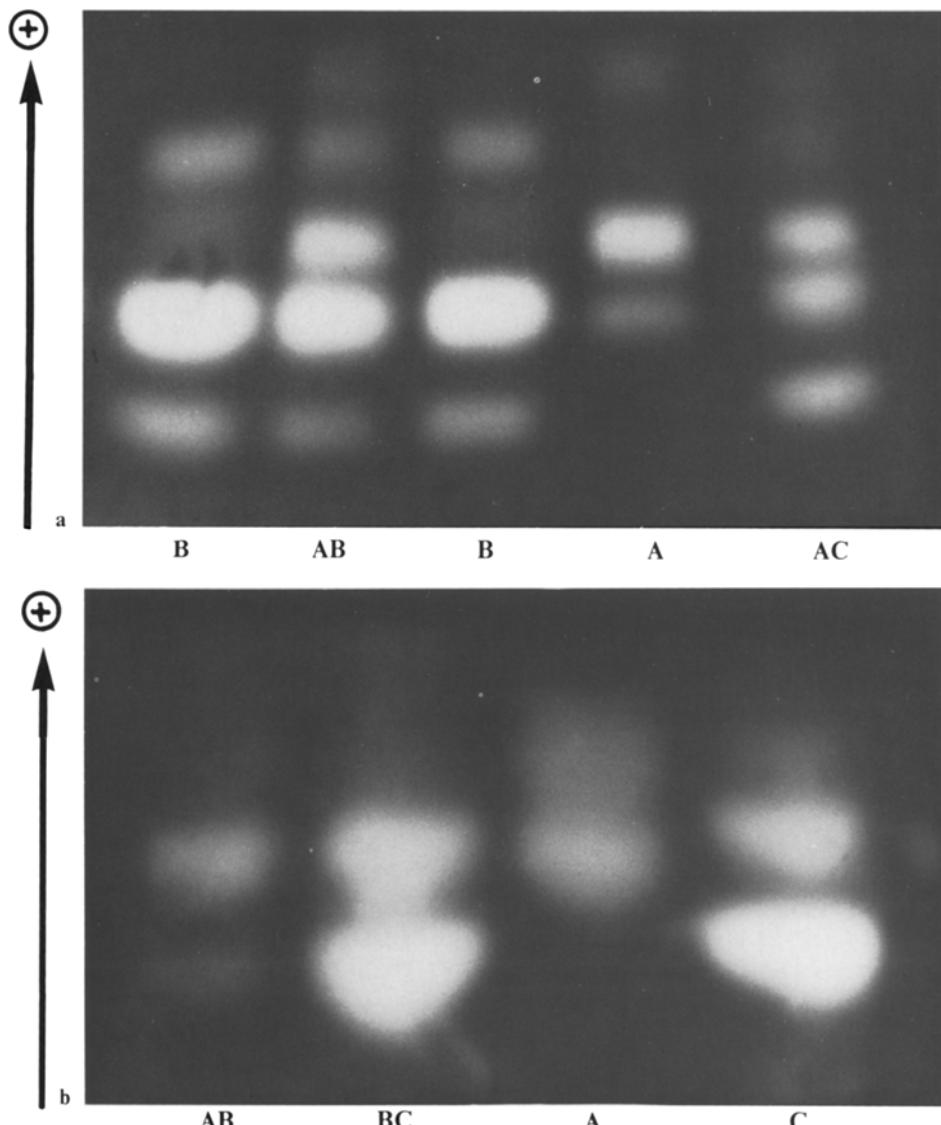


Abb. 1a u. b. Verschiedene Phänotypen der sauren Erythrocytenphosphatase. „Cellogel“-Elektrophorese. a Frische Blutspuren, b Blutspuren auf Glas nach 24tägiger Lagerung bei Raumtemperatur

Der Polymorphismus der sauren Erythrocytenphosphatase (acP) ist ein nahezu idealer Markierer zur Individualisierung der Blutspur. Die Typendifferenzierung aus Blutflecken wurde in der Literatur mehrfach untersucht (Heidel, 1968; Nagata u. Dotzauer, 1970; Smerling, 1969; Brinkmann et al., 1972; Wraxall u. Emes, 1976).

Da sehr unterschiedliche Methoden zur Anwendung kamen, sind die Ergebnisse uneinheitlich und zum Teil widersprüchlich. Die praktische Anwendung in breitem Rahmen stößt u. a. auf folgende Bedenken: Zu hoher (Spuren-) Materialverbrauch; aufwendige und nicht ideal reproduzierbare Elektrophoresetechnik; hohe Enzymlabilität.

Unter Verwendung des fluorogenen Substrats 4-Methyl-Umbelliferylphosphat (White u. Butterworth, 1971; Swallow et al., 1973) gelang die Darstellung der Isoenzyme auch aus anderen Geweben als Erythrocyten; gleichzeitig wurde es möglich, die erforderlichen Probenmengen zu reduzieren. Mit einer anderen Substratkombination wurde in der Agarosetechnik ebenfalls eine Reduktion der Probenmengen erreicht (Sørensen, 1974); mit gleichem Effekt wurde die Polyacrylamidgelelektrophorese eingesetzt (Hoppe et al., 1972). Besonders günstig erscheint daher die Kombination der Dünnschichttechnik mit dem empfindlichen Substrat Umbelliferylphosphat (Martin, 1977; Martin u. Voss, 1978). Diese Methodik sollte in der vorliegenden Untersuchung zur Frage der Anwendbarkeit auf Blutsäuren überprüft werden.

Material und Methoden

Blutsäuren. Blutsäuren von Probanden aller sechs Phänotypen wurden systematisch wie folgt angelegt: Jeder Blutfleck entsprach 50 µl Frischblut (pipettiert). Je eine Serie von Blutflecken wurde auf gereinigtem Leinenstoff und auf Glas angelegt, bei Raumtemperatur über Nacht getrocknet und anschließend jeweils alle Phänotypen auf beiden Spurenträgern unter unterschiedlichen Bedingungen gelagert: a) im Brutschrank bei 37°C mit hoher Luftfeuchtigkeit, b) bei Raumtemperatur (22°C), c) im Kühlschrank (4°C), d) im Tiefkühlschrank (-20°C).

Aufbereitung der Spuren. Jeder Blutfleck wurde getrennt aufbereitet: Abkratzbare Flecken wurden in Mikrogefäß verbracht, 20 µl (bei älteren Spuren 15 µl) Brückenpuffer hinzugefügt und die Schüppchen durch Röhren gelöst. Blutflecken auf Stoff wurden herausgetrennt, zerkleinert, mit 300–400 µl Puffer überschichtet und 2–3 h bei 4°C belassen. Hiernach erfolgte die Trennung der Flüssigkeit vom Spurenträger mittels Zentrifugation durch feimporen Plastikfilter (Saran No. 4/67, Porenweite 0,082 × 0,465 mm). Der Extrakt wurde lyophilisiert und vor Verimpfung durch Zufügen von 15–20 µl Brückenpuffer redissolviert. Bei Lösung älterer Spuren (Zeitpunkt s. unter Ergebnisse) wurde der zur Lösung der Spuren verwendete Brückenpuffer im Verhältnis 1:1 mit einer 50 mmol/l Mercaptoäthanollösung (M.Ä.) vermischt. Abkratzbare Spuren wurden nach Lösung 1–2 h bei Raumtemperatur mit dieser Lösung inkubiert, Blutflecken auf Stoff wurden gelöst und bei Redissolvierung ebenso mit dieser Lösung inkubiert.

Elektrophorese. Sämtliche Bestimmungen wurden parallel zueinander in zwei Ansätzen durchgeführt: Agarose-Dünnschicht-Elektrophorese (Martin u. Voss, 1978) und Elektrophorese auf „Cellogel“-Folien¹ (Martin, 1977). — Je 3–4 µl der Spurenprobe wurden mit Kapillarpipetten strichförmig auf „Cellogel“ verbracht. Anfänglich 5 µl (bei zunehmendem Spurenalter bis zu 10 µl) wurden in die Impfschlitz der Agaroseplatten eingebracht.

¹ Cellulose-Acetat-Folien der Fa. Celtec, Bad Homburg

Puffer und Färbetechnik. Der Stammpuffer enthält 0,11 mol/l NaH₂PO₄; 0,08 mol/l Na-Citrat und 2,5 mmol/l EDTA und wird mit NaOH auf pH 6,9 (Agarose) bzw. 6,4 („Cellogel“) eingestellt. Die Gebrauchsverdünnungen sind: für den Brückenpuffer 1:4 (Agarose) bzw. 1:19 („Cellogel“), für den Gelpuffer 1:9 (Agarose) bzw. 1:19 („Cellogel“). Der Inkubationspuffer ist 1 mol/l Citratpuffer pH 4,8 (Agarose) bzw. 0,1 mol/l Citratpuffer, pH 6,9 („Cellogel“).

Die Substratlösung besteht aus 3–10 mg 4-Methyl-Umbelliferylphosphat ad 10 ml Inkubationspuffer. Je nach Spurenalter und Lagerungsart wird nach einem Pilotversuch die Substratmenge graduell gesteigert. In der Agarosetechnik wird die Substratlösung mittels eines getränkten Filterpapierstückchens in Sandwich-Technik auf die Geloberfläche verbracht. In der „Cellogel“-Technik wird das Substrat in eine auf +50°C abgekühlte Agaroselösung verbracht und ein sog. Agarosesandwich hergestellt. Beide Sandwichs werden 10 min (Agarose) bzw. 30 min („Cellogel“) bei 37°C inkubiert und die Pherogramme bei 350 nm abgelesen und photographiert. Elektrophorese: Bei „Cellogel“-Technik 105 min, 20 Volt/cm; bei Agarosetechnik 75–105 min, 22 bis 25 Volt/cm.

Ergebnisse

Die zeitlichen Nachweisgrenzen sind aus Tabelle 1 ersichtlich.

37°C/Feucht. Bereits nach 3–4 Tagen gelang es mit der Agarosetechnik nicht mehr, Stoffspuren zu differenzieren; bei „Cellogel“-Technik war bis zu 8 bzw. 11 Tagen noch eine eingeschränkte Differenzierung (A-Banden-Verlust) möglich.

20°C/Raum. Nach 16 Tagen erfolgte regelmäßig MÄ-Zusatz. Mit der Agarosetechnik gelang bis zu 20 bis 24 Tagen die eindeutige Erkennung aller Phänotypen aus Stoff, bis zu 39 Tagen die eingeschränkte Differenzierung. Bei Glasspuren war das Ergebnis wechselnd: Im Zeitraum zwischen 39 und 52 Tagen wurden teilweise A-Banden-Verluste beobachtet, teilweise wiederum nicht. In der „Cellogel“-Technik war die Nachweisgrenze der Stoffspuren ähnlich wie in der Agarosetechnik, Glasspuren zeigten bis zu 39 Tagen differenzierbare Typen bei erkennbaren A-Banden.

4°C/Kühlschrank. Ab 3–4 Wochen erfolgte Mercaptoäthanolzusatz. Die Nachweisgrenzen der sicheren Differenzierung betrugen in der Agarosetechnik 31 Tage (Stoffspuren) bzw. 39–59 Tage (Glasspuren). In der „Cellogel“-Technik waren die Phänotypen aus Stoff nach 71 Tagen differenzierbar, von Glas nach 86 Tagen.

Tabelle 1. ACP-Typisierung bei unterschiedlichen Lagerungsbedingungen. Zeitgrenzen und Mindestprobenmengen. Cellogel-Technik

Grenzwerte	Lagerungsbedingungen							
	37°C/feucht		22°C/Raum		4°C/Kühlschr.		–20°C/Tief-Kschr.	
	Stoff	Glas	Stoff	Glas	Stoff	Glas	Stoff	Glas
Nachweis/Tage	3–4 ^a (8–11) ^b	3–4 (8–11)	20–24 (39)	39 (59)	71 (86)	86 (90)	90	93
Mindestprobenmenge/µl ^c	10	10	10	10	15	15	15	15

^a Uneingeschränkte Typisierung möglich

^b Lediglich Partialdiagnosen möglich

^c Frischblutäquivalente, umgerechnet aus der Probenmenge

-20°C /Tiefkühlschrank. Ab 62 Tagen erfolgte M.Ä.-Zusatz. Die Nachweisgrenzen lagen in der Agarosetechnik bei 70 Tagen, in der „Cellogel“-Technik bei 90 Tagen.

Diskussion

1. Wie die Ergebnisse der vorliegenden Untersuchung zeigen, ist die ACP-Typendifferenzierung aus Blutspuren unter Verwendung von Dünnschichttechniken und bei Verwendung eines fluorogenen Substrats ohne großen Aufwand möglich und praktikabel. Gegenüber anderen Dünnschichttechniken wie Agarose (Martin u. Voss, 1978) und Stärke (Wraxall u. Emes, 1976) erbringt die „Cellogel“-Elektrophorese die Vorteile der leichten Handhabbarkeit, der guten Reproduzierbarkeit und des geringen Spurenmaterialverbrauchs.

2. Die in der vorliegenden Studie gefundenen zeitlichen Nachweisgrenzen decken sich zum Teil mit Angaben aus der Literatur (Wraxall u. Emes, 1976); teilweise wurden auch längere (Brinkmann et al., 1972) oder auch kürzere Nachweiszzeiten (Nagata u. Dotzauer, 1970; Heidel, 1968) beschrieben. Diese Differenzen sind methodisch bedingt. So haben wir in einer vorhergehenden, oben zitierten Untersuchungsreihe bei Polyacrylamidelektrrophorese Nachweisgrenzen (Raumtemperaturlagerung) von 6—8 Wochen beschrieben, der Spurenverbrauch betrug mit 60 µl jedoch ein Mehrfaches.

3. Der Vorteil der dargestellten Methode liegt vor allem im extrem geringen Spurenverbrauch. Die jeweils eingesetzten Spurenmengen entsprechen nur einem Bruchteil (20—25%) eines Blutstropfens von 50 µl Größe. Da in vielen praktischen Fällen nur eine solche Spurengröße (entsprechend einem Blutstropfen) zur Verfügung steht, ist restliches Material für den Nachweis weiterer Markierer und für Kontrolluntersuchungen vorhanden. Die Lagerung der Spurenproben bei niedrigen Temperaturen ist in dem gleichen Sinne zu empfehlen wie eine möglichst frühzeitige Untersuchung. Dies führt zu geringerem Materialverbrauch und damit erhöhter Effizienz. (Zum Effekt von Thiolreagenzien auf SH-Enzyme sowie zur Modifikation von SH-Enzymen durch Alterung, Oxydation und andere Einflüsse sei auf die Literatur hingewiesen; siehe z. B. Harris u. Hopkinson, 1976.)

4. *Beweiswert.* Die obigen Zeitgrenzen und Materialverbräuche wurden unter experimentellen Bedingungen bei relativ günstigen Spurenträgern erarbeitet. Dieser Umstand ist in Betracht zu ziehen. Die Variabilität der Spuren in der Praxis und die Einflußmöglichkeiten des Spurenträgers (Waschmittel etc.) sollten im Vergleich zu den vorliegenden Ergebnissen im konkreten Fall sehr vorsichtig bewertet werden. — Alle derartigen Einflußmöglichkeiten vorsichtig abschätzend sollte eine bei Raumtemperatur trocken gelagerte Spur möglichst innerhalb einer Lagerungszeit von maximal 14 Tagen untersucht werden. Eindeutige Elektropherogramme sollten dann auch sicher beurteilbar sein. Bei unbekanntem Spurenalter und bei höherer Lagerungszeit sollte im Zweifelsfall lediglich eine Partialdiagnose gestellt werden (z.B. Feststellung des Vorhandenseins des Allels ACP^C).

Literatur

- Brinkmann, B., Günemann, M., Koops, E.: Investigation on the decay of acid phosphatase types in stored blood stains and blood samples. *Z. Rechtsmed.* **70**, 68—71 (1972)
- Harris, H., Hopkinson, D. A.: Handbook of enzyme electrophoresis in human genetics. Amsterdam, Oxford: North-Holland 1976
- Heidel, G.: Die spurenkundliche Bedeutung der Typen der sauren Erythrozytenphosphatase. *Dtsch. Z. Gerichtl. Med.* **63**, 37—43 (1968)
- Hoppe, H. H., Hennig, W., Brinkmann, B.: Horizontal polyacrylamide electrophoresis for the determination of serum protein (haptoglobin) and red cell enzyme polymorphisms. *Hum. Genet.* **14**, 224—231 (1972)
- Martin, W.: Fluoreszenzmethoden zur Darstellung von Isoenzymen. *Ärztl. Lab.* **23**, 210—218 (1977)
- Martin, W., Voss, Ch.: Die Darstellung der Systeme 6-Phosphogluconat-Dehydrogenase (E.C. 1.1.1.44) und der sauren Erythrozyten-Phosphatase (E.C. 3.1.3.2) in der Agarosegel-Dünn-schicht-Elektrophorese. *Blut* **36**, 35—39 (1978)
- Nagata, T., Dotzauer, G.: Nachweis und Typenbestimmbarkeit der sauren Erythrozyten-phosphatase in Blutspuren. *Z. Rechtsmed.* **67**, 359—363 (1970)
- Smerling, M.: Bestimmung der sauren Erythrozytenphosphatase an alten Blutalkoholproben und in Blutspuren. *Arch. f. Kriminol.* **144**, 161—166 (1969)
- Sørensen, S. A.: Agarose gel electrophoresis of the human red cell acid phosphatase. *Vox Sang.* **27**, 556—563 (1974)
- Swallow, D. M., Povey, S., Harris, H.: Activity of 'red cell' acid phosphatase locus in other tissues. *Ann. Hum. Genet.* **37**, 31—38 (1973)
- White, I. N. H., Butterworth, P. J.: Isoenzymes of human erythrocyte acid phosphatase. *Biochim. Biophys. Acta* **229**, 193—201 (1971)
- Wraxall, B. G. D., Emes, E. G.: Erythrocyte acid phosphatase in bloodstains. *J. Forens. Sci. Soc.* **16**, 127—132 (1976)

Eingegangen am 6. April 1979