

Elektrofokussierung der PGM₁-Subtypen an Blutspuren auf 100 µm Polyacrylamidgel über 4 cm Trennstrecke * **

G. Berghaus und M. Staak

Institut für Rechtsmedizin der Universität Köln, Melatengürtel 60–62, D-5000 Köln 30,
Bundesrepublik Deutschland

PGM₁ Subtyping of Blood Stains by Miniature Ultrathin-layer Isoelectric Focusing

Summary. A technique for PGM₁ subtyping of blood stains by isoelectric focusing on 100 µm polyarylamide gel over a distance of 4 cm is demonstrated. There are savings of about 60% regarding material, time, and blood stain volume as compared to the 10-cm distance.

Key words: Phosphoglucomutase, blood stains – PGM₁ subtyping, miniature ultrathin-layer isoelectric focusing – Blood stains, PGM₁ subtyping

Zusammenfassung. Es wird eine Technik zur PGM₁-Subtypisierung von Blutspuren mittels der Elektrofokussierung auf 100 µm Polyacrylamidgel über eine Trenndistanz von 4 cm angegeben. Bei dieser miniaturisierten Fokussierung sind Einsparungen von ca. 60% bezüglich Materialeinsatz und Zeit zu verzeichnen.

Schlüsselwörter: Phosphoglucomutase, Blutspuren – PGM₁-Subtypen, Ultra-dünnschicht-Elektrofokussierung – Blutspuren, PGM₁-Subtypen

Einleitung

Nachdem Schmitter (1980) in einem ad hoc-Versuch über die Typisierung von Blutspuren im PGM₁-System mittels isoelektrischer Fokussierung auf 100 µm Polyacrylamidgelen berichtete, konnten wir (Berghaus et al. 1981) anlässlich der 60. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Rechtsmedizin in Kiel im September 1981 systematische Untersuchungen auf 100 µm-Gelen vorstellen. Die Fokussierung des PGM₁-Systems auf ultradünnen Gelen ist mittlerweile an

* Herrn Prof. Schleyer zum 70. Geburtstag gewidmet

** Erweiterte Fassung eines Vortrags anlässlich der 61. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Rechtsmedizin in Würzburg, September 1982

Sonderdruckanfragen an: Dr. G. Berghaus (Adresse siehe oben)

Frischbluten optimiert (Goedde 1981; Königs 1983) und durch weitere Arbeiten, speziell im spurenserologischen Bereich, als wertvoll bestätigt worden (Pflug et al. 1981a, b; Berghaus und Staak 1982; Pflug 1982).

In den bisherigen Untersuchungen wurde über eine Trennstrecke von mindestens 10 cm fokussiert, die Trockenbluteinsatzmenge, so konnten wir (Berghaus et al. 1981) in entsprechenden Versuchsreihen nachweisen, lag bei bis zu 4 Wochen alten, unter 4°C gelagertem Trockenblut bei ca. 0,1 mg; bei älteren Spuren mußte zur einwandfreien Differenzierung mit ca. 0,25 mg fokussiert werden.

Um dem Optimierungsziel der forensischen Blutspurenuntersuchung – bei möglichst geringer Spurenmenge, in einem bezüglich der Phänotypenhäufigkeitsverteilung günstigen System reproduzierbare Ergebnisse zu erzielen – einen weiteren Schritt näher zu kommen, war zu überlegen, wie die zur Analyse notwendige Trockenblutmenge weiter reduziert werden könnte. Eine Verminderung der Geldicke auf 50 µm führte in unseren entsprechenden Versuchen, unbeschadet einer Anwendung auf anderes Spurenmaterial, für Trockenblut nicht zu dem gewünschten Ergebnis. Daher blieb der Versuch, die miniaturisierte Ultradünnschicht-Elektrofokussierung (Radola 1981) nutzbar zu machen.

Methode und Ergebnisse

Ausgehend von der Methode, die an Frischbluten bei einer Trennstrecke von 10 cm optimiert und dann für die Trockenblutanalyse adaptiert wurde (Berghaus et al. 1981; Königs 1983), wurden die Trennstrecken schrittweise reduziert und in entsprechenden Versuchsreihen die optimalen Fokussierparameter ermittelt.

Als untere Grenze im Hinblick auf die Handhabung der Gele war nach den Untersuchungen von Radola (1981) eine Trenndistanz von 3 cm anzunehmen. Bei einer derart kurzen Trennstrecke war jedoch eine eindeutige Differenzierung der PGM₁-Subtypen nur schwer möglich. Ausreichend zeigte sich jedoch die Fokussierung über 4 cm Distanz, deren Technik im folgenden beschrieben ist.

Polyacrylamidgele, Ausmaße 230 mm × 120 mm × 0,1 mm, wurden mittels der Klapptechnik auf silanisierte Polyesterfolien aufpolymerisiert (Radola 1980) und vor dem Gebrauch auf die gewünschte Größe (Trenndistanz 4 cm, Gelbreite 6 cm) zugeschnitten. Als Gelparameter sind gewählt: Totale Gelkonzentration 5%, Vernetzungsgrad 3%, Ampholytkonzentration 3%. Die optimale Katalysatormenge ist je nach Charge der einzelnen Detergentien zu optimieren. Wir arbeiteten mit einer 3%igen wäßrigen Lösung Ammoniumperoxidisulfat (Serva). Der pH-Gradient wurde durch Ampholine pH 5-7 (LKB) erzeugt. Weitere Geräte- bzw. Materialkonstellation: Fokussierkammer: Desaphor (Desaga); Netzgerät: 2197 Power Supply (LKB); Kühlung 10°C Frigostat (Desaga); Luftfeuchte in der Kammer: 86-89%, erzeugt durch gesättigte Kaliumchloridlösung (Merck); Elektrodenstreifen der Fa. Desaga 1 cm breit, getränkt mit 0,025 M Glutaminsäure (Merck) und 0,025 M Asparaginsäure (Merck) im Mischungsverhältnis 1:1 als Anolyt und 1%-Äthylendiaminlösungen (Merck) als Katolyt.

Das in Aqua dest. gelöste Trockenblut wurde in einer Menge von 1 bis 2 µl (0,05 bis 0,1 mg Trockenblut enthaltend) 0,5 cm von der Anode auf das Gel aufgetropft.

Die Vorfokussierzeit betrug 10 min bei stabilisierten 200 V, die Fokussierzeit 30 min bei stabilisierten 800 V. Die Enzymvisualisierung erfolgte mittels der Agaroseoverlaytechnik nach Spencer et al. (1964) über 40 min.

Zum anschaulichen Vergleich ist eine Fokussierung über 10 cm Trennstrecke (Abb. 1) der Fokussierung über 4 cm Trennstrecke (Abb. 2) gegenübergestellt. Man erkennt deutlich, daß eine Differenzierung der verschiedenen Subtypen auch bei einer Trennstrecke von 4 cm einwandfrei möglich ist. Die erarbeitete Technik konnte bereits in Routinefällen eingesetzt

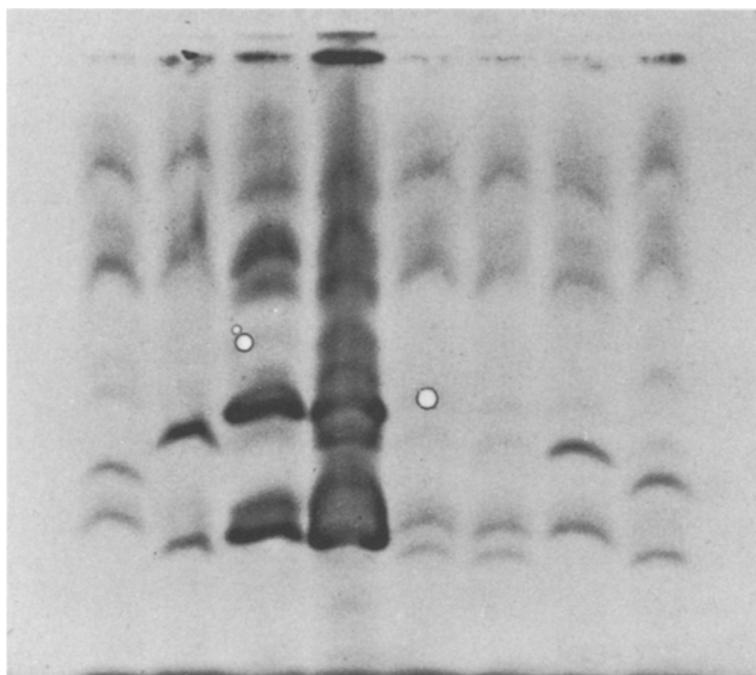


Abb. 1. PGM₁-Subtypisierung über 10 cm Trennstrecke. Trockenbluteinsatz: 5 µl (0,25 mg); Fokussierzeit: 120 min; Subtypen (von links nach rechts): 1: PGM₁ 2-1+, 5 Wochen alt, +4°C; 2: PGM₁ 2+1-, 5 Wochen alt, +4°C; 3 und 4: Leichtentrockenblut, 6 Wochen alt, +4°C, keine Zuordnung möglich; 5: PGM₁ 1+1-, 4½ Monate, +4°C; 6: PGM₁ 1+1-, 5 Monate, +4°C; 7: PGM₁ 2+1+, 5 Monate, +4°C; 8: PGM₁ 2-1-, 5 Monate, +4°C

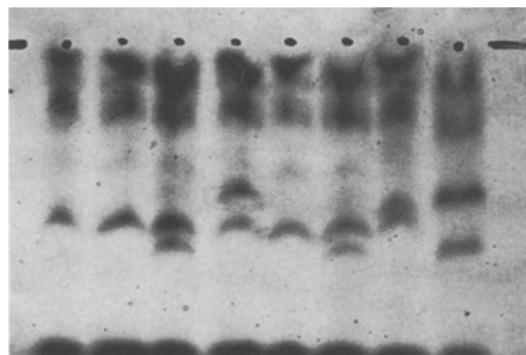


Abb. 2. PGM₁-Subtypisierung über 4 cm Trennstrecke. Trockenbluteinsatz: 2 µl (0,1 mg); Fokussierzeit: 40 min; Subtypen (von links nach rechts): 1: PGM₁ 1+, 4 Wochen, +4°C; 2: PGM₁ 1+, 4 Wochen, +4°C; 3: PGM₁ 1+1-, 4 Wochen, +4°C; 4: PGM₁ 2+1+, 4 Wochen, +4°C; 5: PGM₁ 1+, 4 Wochen, +4°C; 6: PGM₁ 1+1-, 4 Wochen, +4°C; 7: PGM₁ 2-1+, 4 Wochen, +4°C; 8: PGM₁ 2-1-, 4 Wochen, +4°C

werden und liefert wegen der günstigen Subtypenverteilung sowohl bei Identitäts- als auch bei Spurengutachten aussagekräftige Resultate.

Diskussion

Entscheidend bei der Einführung einer kürzeren Trennstrecke bei der PGM_1 -Subtypisierung ist natürlich neben der Reproduzierbarkeit der Resultate die Frage, ob die miniaturisierte Fokussierung auf 100 μm Gelen Vorteile bietet und wie diese zu quantifizieren sind. Da sowohl die Technik über 10 cm Trennstrecke als auch über 4 cm Trennstrecke bei experimentellen Untersuchungen und in Routinefällen vergleichend getestet wurden, können die Einsparungen bei der kürzeren Trennstrecke wie folgt angegeben werden: Ca. 75% beim Materialeinsatz, ca. 60% bei der Trockenbluteinsatzmenge, ca. 70% bei der Fokussierzeit.

Da wir auch im acP- und Tf-System Ergebnisse erzielten, sind wir überzeugt, daß die miniaturisierte Fokussierung auf 100 μm -Gelen für die Blutspurenanalyse eine wertvolle Bereicherung darstellt.

Literatur

- Berghaus G, Staak M (1982) Blutspurenuntersuchung mittels isoelektrischer Fokussierung auf 0,1 mm Gelen. Kongreßband XII. Kongreß der Internationalen Akademie für Gerichtliche und Soziale Medizin, Wien, S 597-598
- Berghaus G, Staak M, Königs L (1981) Blutspurenuntersuchungen mittels ultradünnschicht- isoelektrischer Fokussierung (UDIEF). Vortrag, Deutsche Gesellschaft für Rechtsmedizin, Kiel
- Goedde H, Benkmann HG, Hirth L (1981) Ultrathin-layer isoelectric focusing of subtypes of Gc, Tf, Pi, and PGM_1 . In: Hummel K, Gerchow J (eds) Biomathematical evidence of paternity. Springer, Berlin Heidelberg New York, pp 123-126
- Königs L (1983) Methodische Untersuchungen zur optimalen Fokussierung der PGM_1 -Subtypen auf Polyacrylamidgelen der Schichtdicke 100 μm und 50 μm . Med Dissertation, Universität Köln
- Pflug W (1982) Ultradünnschicht-iselektrische Fokussierung der PGM_1 auf 50 μm und 100 μm Polyacrylamidgelen: Anwendung und Erfahrungen bei der Untersuchung von Frischblut und Blutspuren. Ärztl Lab 28:281-284
- Pflug W, Bruder W, Vigne U de la (1981a) Hochauflösende Ultradünnschicht-Isoelektrofokussierung zur Differenzierung der PGM_1 -Subtypen in der forensischen Blutgruppenkunde. Ref 9. Int Tag Ges Blutgruppenk, Bern, S 273-277
- Pflug W, Vigne U de la, Bruder W (1981b) High resolution ultrathin-layer isoelectric focusing of PGM_1 -subgroups in forensic blood typing. Electrophoresis 2:327-330
- Radola BJ (1980) Ultrathin-layer isoelectric focusing in 50-100 μm polyacrylamide gels on silanized glass plates or polyester films. Electrophoresis 1:43-56
- Radola BJ (1981) GDCH-Fortbildungskurs ultradünnschicht-iselektrische Fokussierung. Kursband
- Schmitter H (1980) Anwendung der ultradünnschicht-iselektrischen Fokussierung bei der forensischen Untersuchung von Blut und Sekretspuren. Elektrophoreseforum, München, S 212-217
- Spencer N, Hopkinson DA, Harris H (1964) Phosphoglucomutase polymorphism in man. Nature 204:742-745