

Literatur

1. DORFMAN, A. und A. E. LORINCZ, Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.) 43, 443 (1957). — 2. MEYER, K., M. M. GRUMBACH, A. LINKER und P. HOFFMAN, Proc. Soc. exp. Biol. Med. 97, 273 (1958). — 3. TELLER, W., Mschr. Kinderhk. 113, 244 (1965). — 4. MAROTEAUX, P. und M. LAMY, J. Pediatr., S. Louis 67, 312 (1965). — 5. RADHAKRISHNAMURTHY, B. und G. S. BERENSON, Analytic. Chem. 35, 1316 (1963). — 6. DISCHE, Z., J. biol. Chemistry 167, 189 (1947). — 7. PELZER, H. und W. STAIB, Clin. chim. Acta (Amsterdam) 2, 407 (1957). — 8. DI FERRANTE, N. und C. RICH, J. Laborat. clin. Med., S. Louis 48, 491 (1956). — 9. HELBERT, J. R. und K. D. BROWN, Analytic. Chem. 33, 1610 (1961). — 10. TELLER, W. und A. ZIEMANN, Klin. Wschr. 44, 1142 (1966).

Privat-Dozent Dr. med. W. Teller
Universitäts-Kinderklinik
355 Marburg/Lahn

Darstellung der Haptoglobintypen durch Elektrophorese in Polyacrylamidgel

Von F. SCHLEYER und P. SCHAIBLE

Aus dem Institut für gerichtliche Medizin der Universität Marburg (Direktor: Prof. Dr. F. Schleyer)

(Eingegangen am 21. Juni 1966)

Es wird eine Abwandlung der Acrylamidgel-Elektrophorese als geschlossenes System zur optimalen Darstellung der Haptoglobintypen im menschlichen Serum beschrieben. Für die Aufnahme der Gelsäulen wurde eine besondere Färbewanne konstruiert. Die entstehenden Bandenspektren erlauben eine hervorragende Differenzierung der Phänotypen. Bei Typ 2—1 konnten bis zu 13 Banden gezählt werden.

A modification of acrylamide gel electrophoresis is described, which employs a closed system and gives an optimum separation of haptoglobin types in human sera. A special dish was constructed for staining the gel columns. The band spectra produced by this method permit an excellent differentiation of phenotypes. Up to 13 bands could be detected in type Hp 2—1.

BAUMGARTEN (1) hat im Jahre 1963 als erster Autor das Acrylamid als Gelmedium zur speziellen Darstellung der Hp-Typen empfohlen. GERVAIS und VESCOU (2) haben die Methode zur Hp-Diagnostik an Blutfleckenausstrichen erprobt. Im folgenden wird eine einfache Standardtechnik beschrieben, die eine hervorragende Hp-Typendarstellung erlaubt. Die physikalisch-chemischen Grundlagen und Methoden der Acrylamidgel-Elektrophorese findet man u. a. bei (3—10) beschrieben.

Methodik

Herstellung des Gels: Als optimale Polymerkonzentration ermittelten wir einen Acrylamidgehalt von 5,5% und eine Vernetzerkonzentration (N,N'-methylbisacrylamid, „MBA“) von 5%, bezogen auf Acrylamid („AA“). Dieses Verhältnis ergibt offenbar den für die Hp-Molekülgröße günstigsten Porendurchmesser und trennt die Hp-Banden bei der gewählten Trennzeit am weitesten und schärfsten. Die durch den relativ hohen MBA-Gehalt bedingte Opaleszenz stört nicht. In dem Präparat „Cyanogum 41“ der „Cyanamid Company“ sind die Monomeren gebrauchsfertig gemischt; der MBA-Gehalt dürfte, der Opaleszenz nach zu urteilen, bei 4—5% liegen. Die Ergebnisse sind gleich. Als Katalysatoren wählten wir β -Dimethylaminopropionitril („DMAPN“) und Ammoniumpersulfat. Das optimale Mischungsverhältnis der Komponenten ist (in dieser Reihenfolge):

Gelpuffer (s. u.)	94,0
AA	5,5
MBA	0,275
DMAPN	0,1
(NH ₄) ₂ S ₂ O ₈	0,1

Jede Komponente muß vor Zugabe der nächsten vollständig gelöst sein. Nach 25—30 Min. (bei Konzentrationen der Katalysatoren von je 0,4% schon nach 2—3 Min.) ist das Gel gebrauchsfertig.

Einfüllen des Gels: Wir arbeiteten in einem geschlossenen, vertikalen Zylindersystem. In senkrecht gestellte Präzisionsglasröhren (13,0 × 0,5 cm), die eine Nummer und bei 10,5 cm eine Marke tragen und am unteren Ende zunächst mit einem Serumstopfen verschlossen werden, pipettiert man etwa 2,3 ml des noch flüssigen Gemisches bis zur Marke. Um bei der Polymerisationszeit von 30 Min., die sich bei Anfall einer größeren Serumprobenzahl empfiehlt, eine glatte Abschlußfläche des Gels zu erzielen, gibt man oben 2 Tropfen Wasser hinzu. Die vollendete Erstarrung ist an einer leichten Opaleszenz zu bemerken. Das überstehende Wasser wird abgossen.

Beschicken des Gels: Nunmehr werden in jede Röhre 0,02 ml des in der üblichen Weise bereiteten Serum-Hp-Gemisches eingetroppt. Sodann werden 2—3 Tropfen einer schnellpolymerisierenden, d. h. mit je 0,4% der Katalysatoren-Komponenten zubereiteten Monomerenmischung (oder eines solchen Cyanogum-Ansatzes) zugegeben. Ist dieses Verschlussgel fest, so wird die überstehende Flüssigkeit abgossen.

Das Elektrophoresegerät: Wir konstruierten ein 3 cm tiefes, zylindrisches, offenes Kathodengefäß von 12 cm Ø aus Trovidur (Hersteller: Fa. Kniese, 355 Marbach bei Marburg). Der Boden dieses Aufsatzes enthält in kreisförmiger Anordnung zwei Reihen von insgesamt 16 leicht konischen Bohrungen von 0,12 cm Ø für die Aufnahme der Röhren. In den Bohrungen stecken passend durchbohrte Gummistopfen. Durch die Mitte des Gefäßbodens führt in einem Trovidur-Rohr die Zuleitung zur Anode. Dem Aufsatz ist ein 13 cm hohes und 10 cm weites Standgefäß aus Glas eingepaßt. Auf seinem Boden kommt die Anode zu liegen (Abb. 1). Nachdem die Stopfen am unteren Röhrende (ohne Sog!) entfernt wurden, werden die gefüllten Glasröhren soweit durch die durchbohrten Gummistopfen im Boden des Kathodenaufsatzes eingedreht, daß sie gerade mit dem oberen Stopfenende abschließen. Sodann wird so viel Elektrodenpuffer (s. u.) in den Glaszylinder eingefüllt, daß die Röhren etwa 0,5 cm tief eintauchen. Die Anode wird durch einen Steckkontakt mit der Zuleitung im Trovidur-Rohr verbunden, und der Aufsatz mit den Röhren eingesetzt. Auf die Gelsäulen in den Röhren wird Puffer bis zum Überlaufen

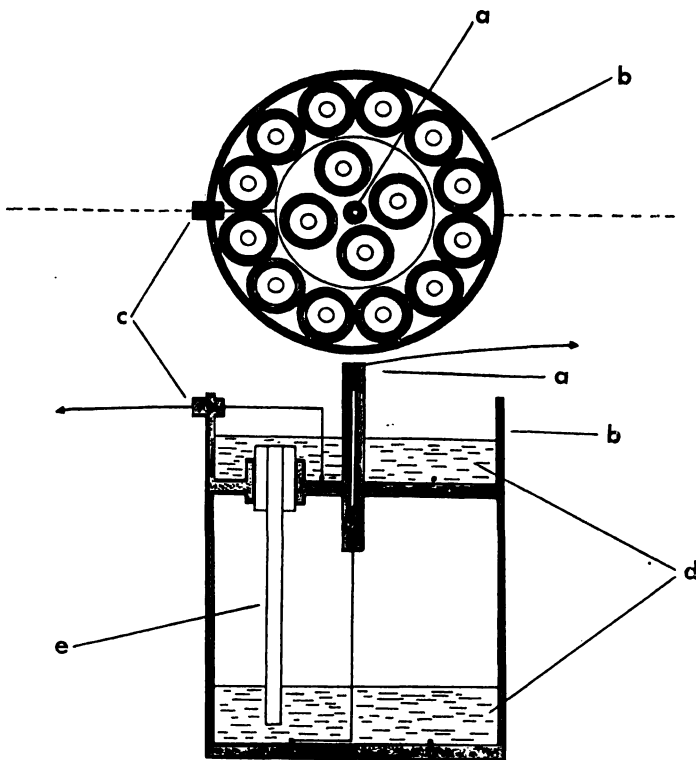


Abb. 1

Das Elektrophoresegefäß

a) Anode; b) Kathodengefäß; c) Kathode; d) Puffer; e) ein Gehröhrchen

gegeben, um den Einschluß von Luftblasen zu verhindern. Das Kathodengefäß wird dann so weit mit Puffer aufgefüllt, daß die Stopfen ganz bedeckt sind. Kathode und Anode werden mit dem Stromgerät verbunden. Als Elektroden dienen Platindrähte, die zur Gewährleistung einer gleichmäßigen Feldstärke kreisförmig zwischen der äußeren und inneren Röhrenreihe angebracht werden.

Puffersystem: Die besten Ergebnisse wurden mit einem diskontinuierlichen Boratpuffersystem gewonnen. Gelpuffer: 0,03M Borsäure, mit NaOH auf pH 8,9 eingestellt; Elektrodenpuffer: 0,3M Borsäure, mit NaOH auf pH 8,5 eingestellt.

Elektrophorese: Es empfiehlt sich, die Stromstärke als Richtgröße zu benutzen. Bei 5 mA pro Röhre ergibt sich eine Spannung von etwa 80 V, die bis zur Hälfte der Gesamtlaufzeit auf etwa 120V ansteigt, dann konstant bleibt oder leicht abfällt, ohne den Ausgangswert wieder zu erreichen. Die Trennzeit beträgt 2,5 Stdn. Bei 3 mA pro Röhre beträgt die Ausgangsspannung etwa 60 V, die Laufzeit 3,5 Stdn. Bei dieser Technik liegt die Bande des freien Hb ganz am Anodenende des Gels. Bei einer Trennzeit von 6–7 Stdn. und 5 mA pro Röhre erhält man eine wesentlich weitere Auftrennung der Hp-Fraktionen. Die Wärmebildung bleibt bei diesen Stromstärken noch in erträglichen Grenzen. Um das Reißen des Gels, besonders bei 5 mA pro Röhre, zu verhindern, stellt man das Gerät während des Laufes am besten in den Kühlschränk. Die Trennung jedes Ansatzes kann durch Verschließen des oberen Röhrenendes mit einem Stopfen jederzeit abgebrochen werden.

Vorbereitung der Färbung: Die Gelsäulen werden zur Lockerung an beiden Enden etwa 1 cm tief mit einer dünnen, aber nicht zu feinen Nadel vorsichtig umfahren und dann mit einer wassergefüllten großen Rekordspritze, die durch ein Schlauchstück mit der Glasröhre verbunden wird, in ein Schälchen mit Wasser ausgepreßt. Die Färbeschale hat die Maße 51,5 × 11 × 2 cm (Hersteller: Fa. H. Wege, 3553 Cölbe); der Boden besteht aus Plexiglas, darauf sind parallel zueinander im Abstand von 0,7 cm Stege von 11 cm Länge, quadratischem Querschnitt und 0,7 cm Kantenlänge geklebt, in jeder Schalenhälfte 8 Stege. Jeder Steg ist an der Oberseite mit 8 — 0,1 × 0,2 cm großen — Querkerben versehen. Die Stege der einen Seite stehen genau vor den Zwischenräumen der anderen Seite. Der Abstand der Stege der einen Schalenhälfte von denen der anderen Hälfte, sowie der Abstand zwischen Kopfende der Stege und kurzer Schalenwand beträgt 0,2 cm. Stege und

Wandungen der Schale sind aus Trovidur. Die 16 Schlitz sind auf der angrenzenden kurzen Wandung mit 1–16 nummeriert. In diese Schlitz werden die Gelsäulen aus der Wasserschale übertragen (Abb. 2).

Färbung: Färbelösung ist 1% Benzidin in 10-proz. Essigsäure; für das beschriebene Färbegefäß sind 50 ml notwendig. Man läßt das Gemisch 15 Min. in das Gel eindiffundieren und fügt dann 0,15 ml Perhydrol unter Bewegen der Schale hinzu. Nach etwa 4–5 Min. preßt man den Deckel aus Plexiglas auf, der mit einem allseitigen Spielraum von 0,1 cm eingepaßt ist und den Stegen aufliegt. Über jedem Schlitz sind 8, 0,3 cm weite Löcher angebracht. Die Färbelösung wird durch diese Öffnungen abgossen, und die Schale mit aufgesetztem Deckel unter fließendem Wasser ausgespült.

Auswertung: Man stellt die Schale mit den angefärbten Gelsäulen auf einen Lichtkasten. Da nur die Schlitz erleuchtet sind, lassen sich auch schwach ausgebildete Banden gut erkennen (Abb. 3, 4).

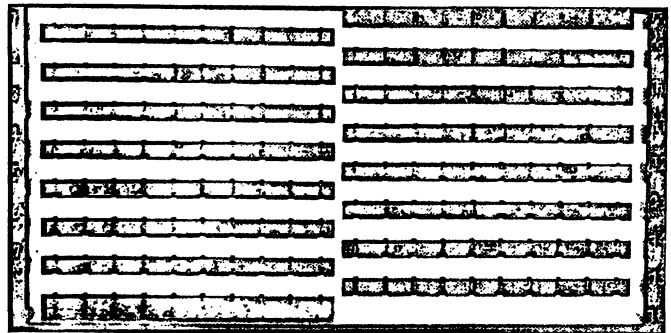


Abb. 2 Die Färbeschale

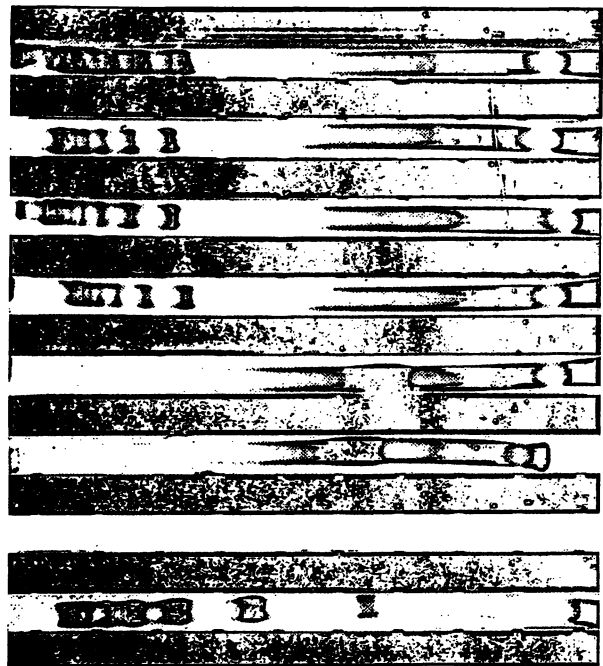


Abb. 3

Eine Hälfte der Färbekammer mit Hp-Typen 2—2, 1—1 und 2—1

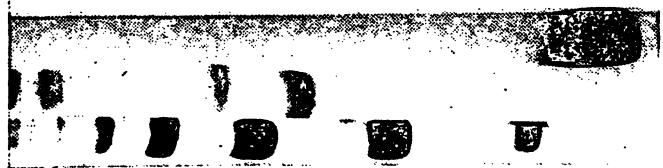


Abb. 4

Die 3 Hp-Typen

Die Gelstreifen wurden für die Aufnahme etwas gequetscht; die als distinkte ringförmige Scheiben angefärbten Fraktionen erscheinen daher etwas verwaschen

Wie am Stärkegel, ist auch hier eine Konservierung der Banden mit Naphtholgelb-S möglich. Die verbleibenden Bilder sind jedoch nicht so gut, da sich das Gel mit einem trüben Film, wohl ausgefalltem Farbstoff, überzieht. Anfärbung mit o-Dianisidin läßt die Banden weniger deutlich erscheinen.

Diskussion

Die Vorteile des Verfahrens sind folgende: einfache Apparatur — nur der Kathodenaufsatz braucht besonders hergestellt zu werden; die einfache Herstellung des Gels ohne Erhitzen; geringer Gelbedarf und sehr niedrige Kosten der Reagenzien (je Einzelerumanalyse nur etwa ein Viertel der Kosten der Elektrophorese im Stärkegel); sehr geringe erforderliche Serummenge; anstelle des Impfträgers unmittelbarer Kontakt zwischen Serum und Gel ohne Störungen durch Grenzflächenphänomene (11); vollständige Ausnutzung der eingegebenen Serummenge; unmittelbarer Kontakt auch zwischen Gel und Puffer; mit Hilfe der Numerierung einfache und verwechslungssichere Zuordnung der Gelstreifen zu den Serumproben während Elektrophorese und Färbung; die bereits in der Literatur immer wieder betonte, glasklare Transparenz des Gels mit der scharfen Abhebung der gefärbten Proteinbanden; weite Distanz zwischen Hb- und Hp-Banden. Das Hp-Banden-spektrum ist so distinkt wie bei der 18-stündigen Stärkegel-Elektrophorese im Tris-Boratpuffer nach ROBSON und Mitarbeitern (12), allerdings nicht so weit auseinandergezogen. Angesichts des stets eindeutigen Ergebnisses genügt ein Ansatz je Serumprobe. Die Empfindlichkeit des Hp-Nachweises ist freilich nicht viel größer als im Stärkegel: sie beträgt etwa $1,0 \mu\text{l}$ Serum für den Typ 1—1 und etwa $1,5 \mu\text{l}$ für die beiden anderen Typen (bei HEIFER (13) $1,5 \mu\text{l}$ im Stärkegel für Typ 1—1).

Der wesentliche Vorteil liegt jedoch in einer differenzierten Trennung der Banden der Typen 2—1 und 2—2. Während die Literatur über die Darstellung der Haptoglobine im Stärkegel gemeinhin 6—8 Banden beschreibt, ROBSON und Mitarbeiter (12) für seltenere Untertypen nur maximal 9 Banden abbilden, und selbst HERMANS und Mitarbeiter (14) mittels AA-Elektrophorese nur 5—6 Banden bei Typ Hp 2—1 und BIEL und Mitarbeiter (8) 9 Banden am gereinigten Hp 2—1 erhielten, fanden wir schon routinemäßig bei den Typen 2—1 und 2—2 bis zu 9—11, bei Hp 2—1 gelegentlich bis zu 13 Banden! Damit erscheint die Methodik der vertikalen Stärkegel-Elektrophorese von SMITHIES (11), der beim Typ Hp 2—2 12 Zonen sehen konnte, mindestens ebenbürtig. Vor allem werden die startnahen, sonst sehr schlecht unterscheidbaren Fraktionen, die man gewöhnlich nur „erahnen“ kann, deutlich erkennbar. Die beschriebene Methodik könnte daher nicht nur einer Verbesserung der gewöhnlichen Hp-Typendiagnostik dienen, sondern auch helfen, die „verborgenen Differenzen“ (15, 16) ohne besondere Präparation zu erkennen und die seltenen Varianten (vgl. neuerdings auch SUTTON und CARP (17)) ohne kompliziertere Verfahren zu determinieren. Über Versuche zur Klassifizierung wird später berichtet werden. Die Methode eignet sich aber auch für die gewöhnliche Untersuchungspraxis. Die angegebenen Maße der Apparatur sind willkürlich und können beliebig abgewandelt werden. Wahrscheinlich läßt sich die Methodik auch noch weiter vereinfachen.

Ein Nachteil des Verfahrens liegt darin, daß Acrylamid kumulativ-neurotoxisch ist. Ein Kontakt des Rohpräparates mit der Haut, Einatmung des Pulvers oder der nichtgeliierten Lösung soll vermieden werden, ist aber bei einiger Vorsicht gar nicht zu befürchten.

Literatur

1. BAUMGARTEN, A., Nature (London) 199, 490 (1963). — 2. GERVAIS, P. und C. VIESCOU, Ann. méd. lég., Paris 45, 244 (1965). — 3. RAYMOND, S. und L. WEINTRAUB, Science (Washington) 130, 711 (1959). — 4. OTT, H., Elektrophorese in Akrylamidgel, in: Protides of the Biological Fluids, 10th Coll. Bruges 1962, S. 305, Elsevier Publ. Comp., Amsterdam. — 5. WHITE, M., J. phys. Chem. 64, 1563 (1963). — 6. ORNSTEIN, L., Ann. N. Y. Acad. Sc. 121, 321. — 7. WILLIAMS, D. und R. REISFELD, Ann. N. Y. Acad. Sc. 121, 373. — 8. BIEL, H., N. HEIMBURGER, D. KRAFT und R. SCHMIDTBERGER, Behringwerk-Mitt. 43, 1 (1964). — 9. WIEME, R., Agar Gel Electrophoresis, Elsevier Publ. Comp., Amsterdam (1965). — 10. ZWISLER, O. und H. BIEL, diese Z. 4, 58 (1966). — 11. SMITHIES, O., Biochem. J. 71, 585 (1959). — 12. ROBSON, E., A. GLENN-BOTT, T. CLEGHORN und H. HARRIS, Ann. hum. Genet. 28, 77 (1964). — 13. HEIFER, U., Blut 10, 113 (1964). — 14. HERMANS, P., W. MCGUCKIN, B. MCKENZIE und E. BAYRD, Staff Meet. Mayo Clin. 35, 792 (1960). — 15. CONNELL, G., G. DIXON und O. SMITHIES, Nature (London) 193, 505 (1962). — 16. NANCE, W. und O. SMITHIES, Nature (London) 198, 869 (1963). — 17. SUTTON, H. und G. CARP, Amer. J. hum. Genet. 16, 419 (1964).

Professor Dr. F. Schleyer
355 Marburg, Mannkopfstr. 2