

Aus dem Institut für gerichtliche Medizin der Universität Gifu (Japan)
(Direktor: Prof. Dr. H. SUYAMA)

Die Bestimmung der menschlichen Samenflüssigkeit durch ein anti-saures Prostata-Phosphatase-Serum

Von

HIROFUMI SUYAMA und HIDEO SAWADA

Mit 5 Textabbildungen

(Eingegangen am 24. Mai 1962)

Für eine spezifische Bestimmung der Samenflüssigkeit in der praktischen Gerichtsmedizin ist es am vorteilhaftesten, die Samenzellen zu ermitteln. Bei Azoo- und Oligospermie aber, oder beim Fehlen der Samenzellen überhaupt, muß die Samenflüssigkeit auf chemischem Wege festgestellt werden. Von den verschiedenen Bestimmungsmethoden der Samenflüssigkeit in der gerichtlichen Medizin eignet sich die Prüfung des Materials auf saure Prostata-Phosphatase am besten. Doch von WEYBICH (1956), HAUCK und LEITHOFF (1959) wurde festgestellt, daß die Ermittlung der sauren Phosphatase für den Nachweis der Samenflüssigkeit nicht spezifisch ist, da ein ähnliches Ferment, das nahezu die gleiche Farbreaktion wie saure Prostata-Phosphatase ergibt, in beträchtlichen Mengen in vielen Pflanzen vorkommt.

Für eine serologische Bestimmung der Samenflüssigkeit verwendeten FARNUM (1901) und HEKTOEN (1922) u. a. Antiserum von Kaninchen, die sie mit menschlicher Samenflüssigkeit immunisiert hatten. GRADWOHL (1954) berichtete von einer Bestimmung der menschlichen Samenflüssigkeit in der Gerichtsmedizin mittels einer Präzipitin-Reaktion durch Antihuman-Samen-Serum, fügte jedoch hinzu, daß die Gegenwart von anderen Körperflüssigkeiten, die neben dem Samen im Untersuchungsmaterial vorhanden sind, Nebenreaktionen hervorrufen. Menschliche Samenflüssigkeit, als Antigen zur Herstellung des Antiserums verwendet, enthielt bei all diesen Untersuchungen in hohen Konzentrationen Proteine und andere chemische Bestandteile (MANN 1954). Solange das erwähnte Antiserum bei der serologischen Bestimmung der Samenflüssigkeit angewandt wird, sind Nebenreaktionen nicht zu vermeiden.

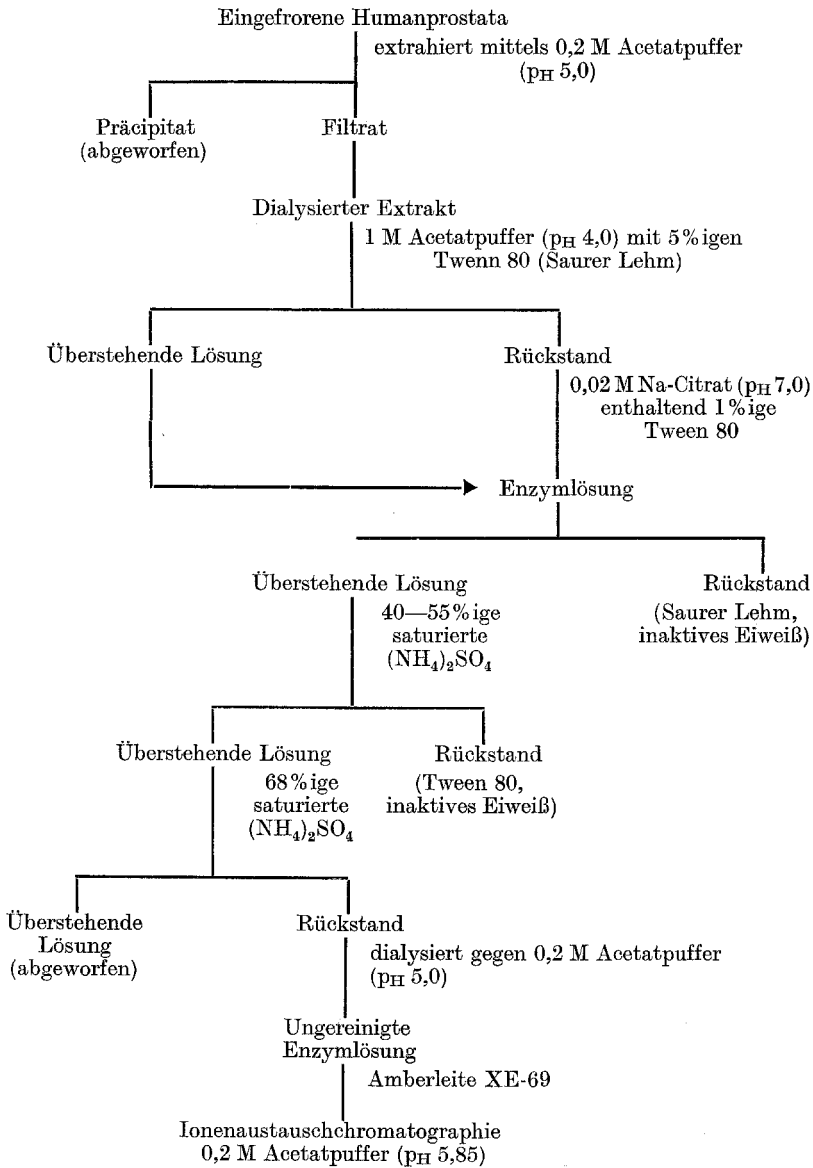
Was die immunologischen Untersuchungen anbelangt, so prüften wir in einer Antigen-Antikörper-Reaktion die Antigenwirkung von der durch Säulenchromatographie fraktionierten sauren Prostata-Phosphatase, die aus menschlichem Prostatagewebe isoliert wurde.

Material und Methoden

1. Als Ausgangsmaterial diente menschliches Prostatagewebe, das von Leichen entfernt und bei etwa -15°C gelagert wurde.
2. Der Proteingehalt wurde mit einem Hitachi-Spektrophotometer bei $280\text{ m}\mu$ bestimmt (BOMAN 1955).
3. Die saure Phosphatase-Aktivität wurde nach der Methode von KING und ARMSTRONG (1934) gemessen.
4. Die Chromatographie wurde nach dem Verfahren von LONDON u. a. mit Amberlite XE-69 ausgeführt (LONDON u. Mitarb. 1953). Zur Elution dient $0,2\text{ m}$ Acetatpuffer, $\text{pH } 5,85$.
5. Das gereinigte Enzym wurde in physiologischer Salzlösung aufgelöst und Kaninchen für ihre Immunisierung injiziert. Für jedes Tier werden sieben Dosen zu je 2 mg Protein pro kg des Körpergewichtes in Intervallen von 2 Tagen verabreicht. Nach einer Woche der letzten Dosierung wurde das Blut vom Herzen entnommen.
6. Die Präcipitin-Tests wurden in entsprechenden Reagensgläsern durchgeführt. Eine innerhalb von 15 min stattfindende positive Reaktion wurde mit $+++$, von $15\text{--}30\text{ min}$ mit $++$, von $30\text{--}60\text{ min}$ mit $+$ und eine negative Reaktion mit $-$ vermerkt.
7. Die Antigen-Antikörper-Reaktion in Agar-Gel wurde nach OUCHTERLONYS Methode vorgenommen (WILSON u. Mitarb. 1954).
8. Es wurden frisch erhaltene Körperflüssigkeiten und Gewebe benutzt. Die gereinigte saure Pflanzen-Phosphatase wurde aus *Brassia oleracea* L. var. *Capitata* L. isoliert.
9. Die menschliche Samenflüssigkeit wurde auf Mull gebracht, bei Zimmertemperatur getrocknet und bei Gebrauch in einen Behälter gelegt.

Resultate

Das Reinigungsverfahren für saure Prostata-Phosphatase: Gefrorene menschliche Prostaten werden in 1 mm -Scheiben geschnitten, gewogen, drei Volumenanteile $0,2\text{ m}$ Acetatpuffer $\text{pH } 5,0$ beigefügt und in einem Kühlschrank unter gelegentlichem Umrühren $48\text{--}72\text{ Std}$ extrahiert. Der erste Extrakt wird durch ein Nesseltuch gepreßt, die zweite Extraktion wird nach Zugabe von zwei Volumenanteilen $0,2\text{ m}$ Acetatpuffer in ähnlicher Weise ausgeführt. Die gesammelten Extrakte werden gegen destilliertes Wasser dialysiert. Zum dialysierten Extrakt werden ein Neuntel des Volumens 1 m Acetatpuffer $\text{pH } 4,0$ (5% Tween enthaltend) und $\frac{1}{25}$ des Volumens an saurem Ton beigegeben. Die Mischung wird 5 min lang geschüttelt und bei 3000 r.p.m. zentrifugiert. Dauer: 15 min . Nach Entfernen des Überstandes wird das Sediment mit dem am sauren Ton adsorbierten Protein in $0,02\text{ m}$ Na-Citrat, $\text{pH } 7,0$ und 1% Tween resuspendiert. Danach rührt man die Mischung gut durch, so daß der



größte Teil an adsorbiertem Enzym in der Lösung aufgeht. Die gereinigten Enzymlösungen werden mit einem geeigneten Acetatpuffer sofort auf p_H 5,8 gebracht und bei weniger als $20^\circ C$ auf etwa ein Viertel ihres ursprünglichen Volumens konzentriert. Die konzentrierte Lösung wird bei 3000 r.p.m. zentrifugiert, um den restlichen sauren Ton und inertes

Material zu entfernen. Die Enzymfraktion wird mit 68% iger gesättigter Ammonsulfatlösung präzipitiert und durch Zentrifugation abgetrennt. Der Bodensatz wird gegen 0,2 m Acetatpuffer pH 5,0 dialysiert. Die auf diese Weise vorgereinigte Enzymlösung wird über eine Säule aus Amberlite XE-69 chromatographiert. Der Aufarbeitungsgang ist in Abb. 1

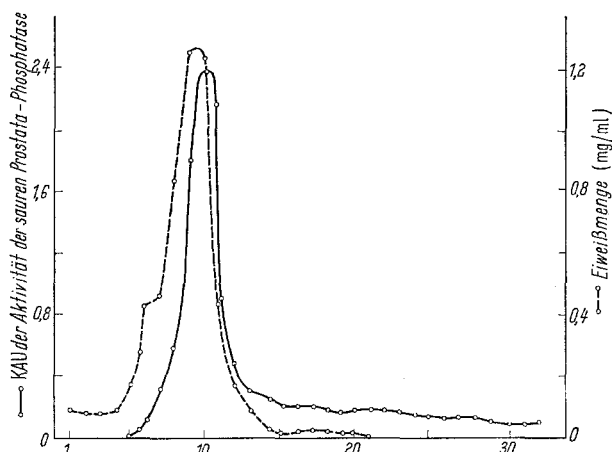


Abb. 1. Chromatographische Fraktionierung der sauren Prostata-Phosphatase mittels Amberlite XE-69 (Fraktionsvolumen 12 ml)

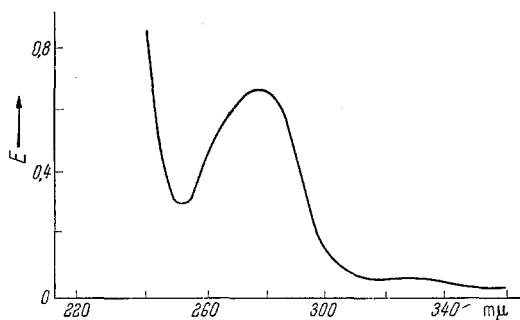


Abb. 2. UV-Spektrum der sauren Prostata-Phosphatase bei pH 5,5. Das gebrauchte Enzym ist genommen aus der Fraktion mit maximaler Aktivität von der Ionenaustauschchromatographie, die in Abb. 1 gezeigt worden ist

Tabelle 1

Fraktion	Volum (ml)	Eiweißgehalt (mg/ml)	Enzymatische Aktivität (E^1 /ml)	Totale Aktivität (E^1)	Spezifische Aktivität E^1 /mg Eiweiß
Ungereinigtes Enzym	110	2,0	560	61 600	280
Fraktion mit der maximalen Aktivität . .	12	1,25	2400	28 800	1920

¹ K. A. U.

wiedergegeben. Die gereinigte Fraktion an saurer Prostata-Phosphatase wird gegen destilliertes Wasser dialysiert, lyophilisiert und im Kühlschrank bis zum Gebrauch als Antigen aufbewahrt. Das UV-Spektrum

Tabelle 2. Die Präcipitationen der menschlichen sauren Prostata-Phosphatase und menschliches Serum bei Anwendung von Antiserum

Unadsorbiert von menschlichem Serum		Adsorbiert von menschlichem Serum		
Verdünnung des Antigens $1:5 \cdot 2^n$		Verdünnung des Antigens $1:2^n$		
$1:2^n$	$n=0$ 1 2 3 4 5 6 7 8	$1:2^n$	$n=1$ 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11	
Verdünnung des Antiserums	0	## # # # # + - - - -	0	## # # # # # # # + - - -
	1	## # # # # + - - - -	1	## # # # # # # # # + - - -
	2	## # # # # + - - - -	2	## # # # # # # # # + - - -
	3	## # # # # + - - - -	3	+ + + + + + + + + - - -
	4	## # # # # - - - - -	4	+ + + + + - - - - - - -
	5	## # # # + - - - - -	5	+ + + + - - - - - - - -
	6	+ + + + - - - - -	6	- - - - - - - - - - - -
	7	- - - - - - - - - - -	7	- - - - - - - - - - - -
	8	- - - - - - - - - - -	8	- - - - - - - - - - - -
Antigen: Saure Prostata-Phosphatase		Antigen: Humanserum		

Verdünnung des Antigens $1:5 \cdot 2^n$		Verdünnung des Antigens $1:2^n$		
$1:2^n$	$n=0$ 1 2 3 4 5 6 7 8	$1:2^n$	$n=1$ 2 3 4 5 6 7 8 9 10	
Verdünnung des Antiserums	0	## # # # # - - - - -	0	- - - - - - - - - - - -
	1	## # # # + - - - - -	1	- - - - - - - - - - - -
	2	## # # # + - - - - -	2	- - - - - - - - - - - -
	3	## # # # + - - - - -	3	- - - - - - - - - - - -
	4	## # # # + - - - - -	4	- - - - - - - - - - - -
	5	+ + # + - - - - -	5	- - - - - - - - - - - -
	6	- - - - - - - - - - -	6	- - - - - - - - - - - -
	7	- - - - - - - - - - -	7	- - - - - - - - - - - -
	8	- - - - - - - - - - -	8	- - - - - - - - - - - -
Antigen: Saure Prostata-Phosphatase		Antigen: Humanserum		

der Enzymlösung zeigt ein Maximum bei 280 m μ . Die Antigen-Antikörper-Reaktion mit Antiserum aus immunisierten Kaninchen und der gereinigten sauren Phosphatase als Antigen ergibt folgende Ergebnisse:

1. Die Präcipitation ist mit menschlicher saurer Prostata-Phosphatase sowie mit menschlichem Serum als Antigen positiv.
2. Von Humanserum adsorbiertes Antiserum zeigt nur eine positive Reaktion mit dem eingespritzten Antigen (saure Prostata-Phosphatase).

3. Von Humanserum adsorbiertes Antiserum ergibt mit menschlichem Harn, Speichel (gekocht), Nasenschleim, Eiter, Rinderserum,

Tabelle 3. Saure Phosphatase-Aktivität der menschlichen Organe

Organ	Aktivität der sauren Phosphatase (K.A.U./g)
Samenflüssigkeit	16793
Prostata	18000
Hoden	27
Leber	19
Niere	13
Lunge	23
Milz	20

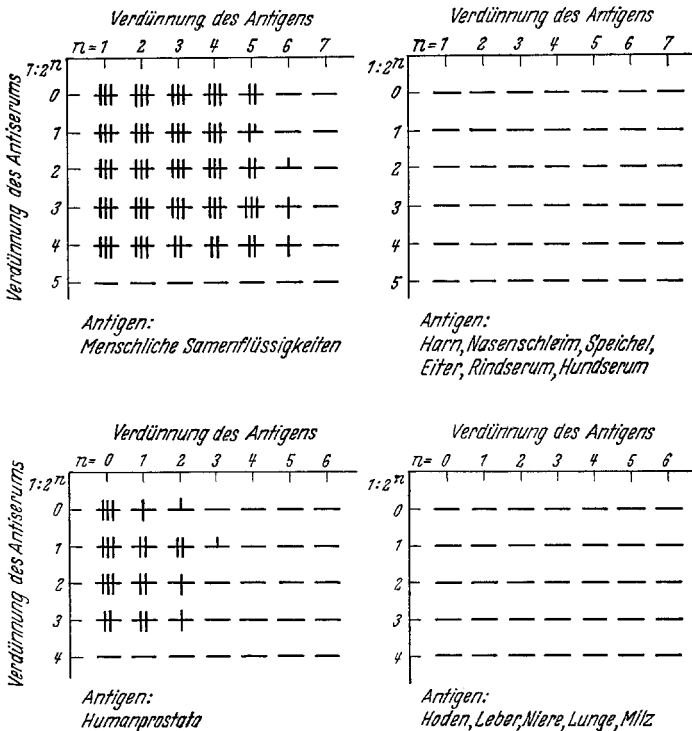
Hundeserum und saurer Pflanzen-Phosphatase eine negative Reaktion. Die physiologischen Salzextrakte aus menschlichen Prostata, Leber, Niere, Milz und Hoden zeigen nur positive Reaktionen mit dem Prostataextrakt, die Extrakte aus anderen Geweben reagieren negativ (Tabelle 4).

4. Die Prüfung der physiologischen Salzextrakte von Samenflecken nach verschiedenen langen Zeitabschnitten

ihrer Entstehung ergibt eine positive Reaktion, wenn die Flecken bis zu 3,5 Jahre als sind (Tabelle 5).

Tabelle 4. Die Präcipitationen der Körperflüssigkeiten und Organextrakte usw. bei Anwendung von Antiserum adsorbiert von menschlichem Serum

(Verdünnung des Antigens: 2n).



Antigen: Menschliche Samenflüssigkeiten

Antigen: Harn, Nasenschleim, Speichel, Eiter, Rinderserum, Hundeserum

Antigen: Humanprostata

Antigen: Hoden, Leber, Niere, Lunge, Milz

Tabelle 5. Die Präcipitationen der Samenflüssigkeiten bei Anwendung von Antiserum
 Die Samenflecken wurden mittels 0,2 ml physiologischer Salzlösung extrahiert.
 Der Extrakt wurde als Antigen gebraucht. (Verdünnung des Antigens: 2n.)

		1 Monat							3 1/6 Jahr				
		Verdünnung des Antigens							Verdünnung des Antigens				
		n=0	1	2	3	4	5	6	n=0	1	2	3	4
Verdünnung des Antiserums	2 ⁿ												
	0	+++	+++	+++	+++	++	—	—	+++	+++	—	—	—
	1	+++	+++	+++	+++	++	—	—	+++	+++	—	—	—
	2	+++	+++	+++	+++	++	+	—	+++	+++	—	—	—
	3	+++	+++	+++	+++	+	—	—	+++	+++	—	—	—
	4	+++	+++	++	+	—	—	—	+	+	—	—	—
	5	+	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
6	—	—	—	—	—	—	—						

		3 1/2 Jahr					4 1/6 Jahr				
		Verdünnung des Antigens					Verdünnung des Antigens				
		n=0	1	2	3	4	n=0	1	2	3	4
Verdünnung des Antiserums	2 ⁿ										
	0	++	+	—	—	—	+	—	—	—	—
	1	+++	++	—	—	—	—	—	—	—	—
	2	++	++	—	—	—					
	3	++	++	—	—	—					
	4	+	+	—	—	—					
5	—	—	—	—	—						

		9 1/3 Jahr				
		Verdünnung des Antigens				
		n=0	1	2	3	4
Verdünnung des Antiserums	2 ⁿ					
	1	—	—	—	—	—
	2	—	—	—	—	—

5. Die Reaktion ist mit Serum von Prostata-Krebskranken positiv, deren Konzentration an saurer Prostata-Phosphatase im Serum hoch ist (Tabelle 6).

6. Bei der Agar-Diffusion ergaben die Antigen-Antikörper-Reaktionen nur mit dem an Human-Serum adsorbierten Antiserum entweder mit dem Antigen oder mit der menschlichen Samenflüssigkeit eine einzige Bande, nicht aber mit Human-Serum (Abb. 3 und 4).

7. Durch Erhitzen oder mit dem Schwermetall Quecksilber inaktivierte Antigene reagieren mit dem anti-sauren Prostata-Phosphatase-Serum bei der Agar-Diffusion negativ (Tabelle 7).

8. Es findet sich eine Neutralisation der sauren Phosphatase-Aktivität durch Antikörper (Abb. 5).

Diskussion

Die Antigenwirkung von biologisch aktiven Enzymen ist auf dem Gebiete der Immunologie besonders dann von Interesse, wenn die enzymatischen Proteine gut gereinigt werden können. Die Antigen-

wirkung ist bei vielen Enzymen beschrieben worden, einschließlich Urease (KIRK u. Mitarb. 1931), Ribonuklease (CINADER u. Mitarb. 1958), α -Glycerophosphatase (SEVAG u. Mitarb. 1954) usw. Es sind Ver-

Tabelle 6. Die Aktivitäten der sauren Phosphatase im Serum und die Präcipitationen durch das Antiserum

(Verdünnung des Antigens: 2n). KAU: Die Aktivität der sauren Phosphatase.

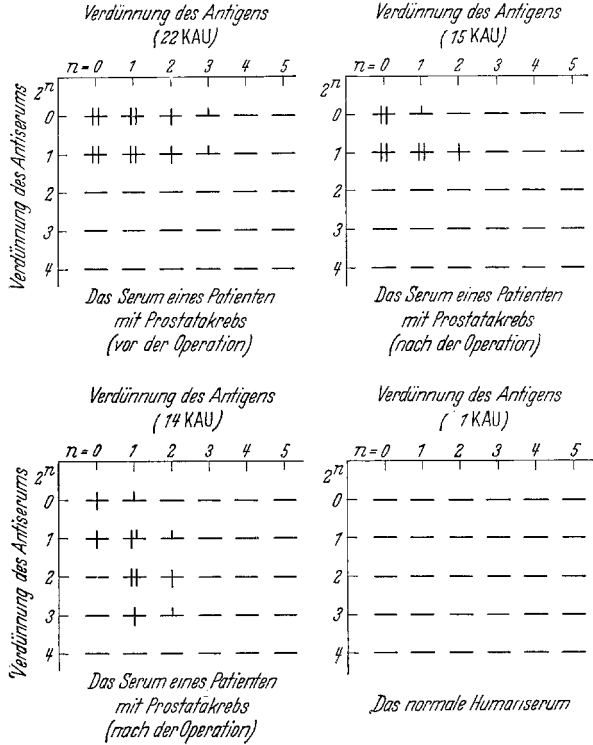
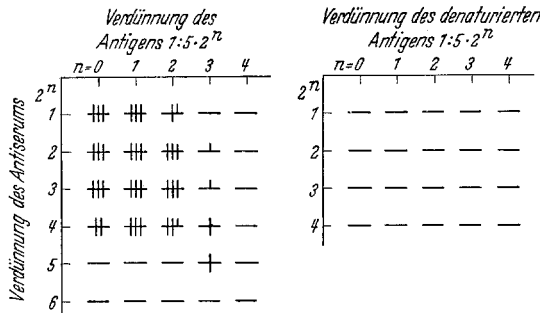


Tabelle 7. Die Präcipitationen des normalen Antigens und des denaturierten Antigens durch Erhitzung ($65^{\circ}C$, 15 min) oder $HgCl_2$ ($10^{-3} M$)



suche unternommen worden, die Immunochemie zur Synthese von enzymatischen Proteinen zu benutzen. Über das Verhalten einer sauren Phosphatase, die in hohen Konzentrationen in menschlicher Prostata vorkommt, ist viel gearbeitet worden (SCHMIDT 1955, MAEOKA 1960); doch

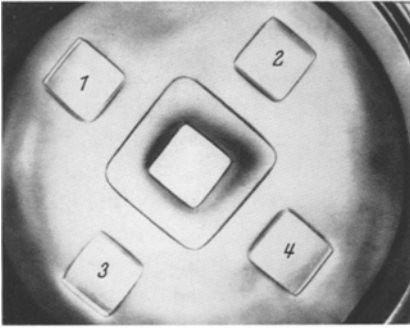


Abb. 3

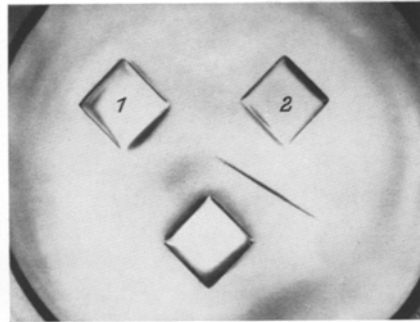


Abb. 4

Abb. 3 u. 4. Das Erscheinen der Präzipitate in der Platte verändert durch das Antiserum. Abb. 3. Zentrum: Das anti-saure Prostata-Phosphatase-Serum (unverdünnt). Nr. 1 und Nr. 4: Die Flüssigkeiten mit der maximalen Aktivität (Antigen). Nr. 2 und Nr. 3: Menschliche Samenflüssigkeiten

Abb. 4. Unten: Das anti-saure Prostata-Phosphatase-Serum (unverdünnt). Nr. 1: Humanserum. Nr. 2: Antigen. Präzipitinversuche zwischen der anti-sauren Prostata-Phosphatase und den verschiedenen Antigenen. Photographiert nach 14 Tagen

wurde bisher kein Befund über immunologische Untersuchungen dieses Enzyms veröffentlicht.

Wir erhalten ein Antiserum aus immunisierten Kaninchen, wenn die isolierte und mit Ionenaustauschchromatographie hoch gereinigte menschliche saure Prostata-Phosphatase als Antigen benutzt wird. FARNUM (1901), PFEIFFER (1905), HEKTOEN (1922), KAGAWA (1929), GRADWOHL (1954), WEIL (1956), FLOCKS (1960) u. a. berichten über die Antigenwirkung von Samenflüssigkeit, Samenplasma, Samenkörperchen und Prostataextrakt. Keiner dieser Antigene ist eine einzelne gereinigte Sub-

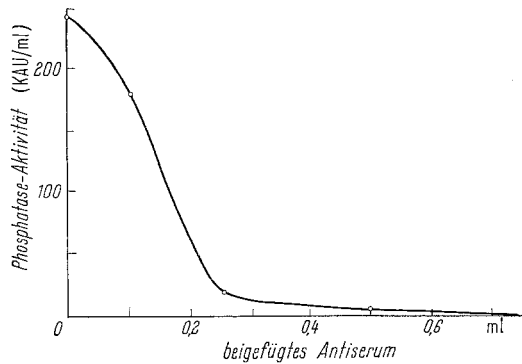


Abb. 5. Neutralisationskurve des sauren Prostata-Phosphatase-Antigens (1:1) 0,1 ml

stanz, begreiflicherweise sind noch andere menschliche Proteine als Antigene vorhanden. Alle Antisera, die von den oben erwähnten Autoren erhalten wurden, zeigen natürlich bestimmte Nebenreaktionen. Im Gegensatz dazu ergibt das von uns hergestellte Antiserum nur

mit Samenflüssigkeit und saurer Prostata-Phosphatase eine positive Reaktion; die Art- und Organspezifität ist sehr hoch. Das Antiserum sollte daher für den Gebrauch in der praktischen Gerichtsmedizin als eine Substanz in Betracht gezogen werden, die zur serologischen Identifizierung von Samenflüssigkeit befähigt ist.

Was die immunologischen Untersuchungen anbelangt, so wurde von uns mit der Antigen-Antikörper-Reaktion die Antigenwirkung der chromatographierten Fraktion, die mit einem Fraktionssammler erhalten wurde, geprüft. Die Antigen-Antikörper-Reaktion in Agar-Gel ist bei den Fraktionen mit hoher enzymatischer Aktivität positiv. Bei der vergleichenden Untersuchung von menschlicher Samenflüssigkeit und menschlichem Serum ist die Reaktion nur mit Samenflüssigkeit positiv. Nach der Methode von OUCHTERLONY wurde bei Verwendung von Samenflüssigkeit und bei saurer Prostata-Phosphatase eine Streifenbande festgestellt. Diese Befunde sprechen für eine spezifische Reaktion. Die enzymatische Aktivität wurde durch Antiserum ziemlich neutralisiert. Das Antiserum wurde durch Immunisierung mit saurer prostaticher Phosphatase erhalten. Ist das Antigen bei der serologischen Reaktion durch Erhitzen bzw. durch Zugabe von Quecksilber denaturiert worden, erhält man sowohl mit der Präcipitinmethode als auch bei der Agar-Gel-Diffusion keine Reaktion. Die Antigenwirkung wird durch denaturierte Enzyme demnach geändert.

Unsere experimentellen Untersuchungen haben gezeigt, daß das betreffende Enzym bei den angewendeten Verfahren zur Bestimmung der Samenflüssigkeit mit Antigen-Antigenwirkung besitzt. Dazu ist eine Voraussetzung notwendig. Das Enzym in der Samenflüssigkeit und in den Samenflecken darf nicht denaturiert sein. Die durchgeführten Untersuchungen besagen, daß das von uns erhaltene antisaurer Prostata-Phosphatase-Serum für eine ganz bestimmte Antigen-Antikörper-Reaktion geeignet ist und daß seine Antigenwirkung und enzymatische Aktivität besonders nahe miteinander verwandt sind.

Zusammenfassung

Um Antiserum mit hoher Spezifität gegenüber menschlicher Samenflüssigkeit zu erhalten, wird die saure Phosphatase aus menschlichen Prostata isoliert mit Ionenaustauschchromatographie gereinigt und als Antigen zur Immunisierung von Kaninchen verwendet. Es wurde gefunden, daß das resultierende Antiserum wirkungsvoller als das bekannte Antihuman-Samen-Serum in bezug auf Art- und Organspezifität ist. Zwischen der sauren Prostata und der sauren Pflanzen-Phosphatase konnte mit dem vorliegenden Antiserum ein Unterschied festgestellt werden, ihre Farbreaktionen dagegen sind ähnlich. Aus diesem Grunde

scheint das Antiserum für die serologische Bestimmung von Samenflecken geeignet zu sein.

Literatur

- BOMAN, H. G.: *Biochim. biophys. Acta* **16**, 245 (1955).
CINADER, B., and J. H. PEARCE: Symposium on protein structure (edited by A. NEUBERGER) 1958, S. 240.
FARNUM, C. G.: *J. Amer. med. Ass.* **37**, 1721 (1901).
FLOCKS, R. H., V. C. URICH, C. A. PATEL and J. M. OPITZ: *J. Urol. (Baltimore)* **84**, 134 (1960).
GRADWOHL, R. B. H.: *Legal Medicine*, p. 595. St. Louis: C.V. Mosby Co. 1954.
HAUCK, G., u. H. LEITHOFF: *Dtsch. Z. ges. gerichtl. Med.* **49**, 5 (1959).
— — *Dtsch. Apoth.-Ztg* **99**, 351 (1959).
HEKTOEN, L.: *J. Amer. med. Ass.* **78**, 704 (1922).
KAGAWA, S.: *Shakai-Igakuzasshi* **512**, 851 (1929).
KING, E. J., and A. R. ARMSTRONG: *Canad. med. Ass. J.* **31**, 376 (1934).
KIRK, J. S., and J. B. SUMNER: *J. biol. Chem.* **94**, 21 (1931).
LONDON, M., and P. B. HUDSON: *Arch. Biochem.* **46**, 141 (1953).
— A. SOMMER and P. B. HUDSON: *J. biol. Chem.* **216**, 81 (1953).
MAEOKA, I.: *Acta Sch. med. Gifu* **8**, 946 (1960).
MANN, T.: *The biochemistry of semen*. London: Methuen 1954.
PFEIFFER, H.: *Wien. med. Wschr.* **18**, 637 (1905).
SCHMIDT, G.: In: *Methods in enzymology* (Editors: S. P. COLOWICK and N. O. KAPLAN), vol. II, p. 523. New York: Academic Press Inc. 1955.
SEVAG, M. G., M. D. NEWCOMB and R. E. MILLER: *J. Immunol.* **72**, 1 (1954).
WELL, A. J.: *Science* **131**, 1040 (1960).
— and A. E. FINKLER: *Proc. Soc. exp. Biol. (N.Y.)* **98**, 794 (1958).
— O. KOTSEVALOV and L. WILSON: *Proc. Soc. exp. Biol. (N.Y.)* **92**, 606 (1956).
— and J. M. RODENBURG: *Proc. Soc. exp. Biol. (N.Y.)* **105**, 43 (1960).
— L. WILSON and A. E. FINKLER: *J. forens. Sci.* **4**, 372 (1959).
WEYRICH, G.: *Arch. Kriminol.* **118**, 154 (1956).
WILSON, M. W., and B. H. PRINGLE: *J. Immunol.* **73**, 232 (1954).

Prof. Dr. H. SUYAMA und Dr. H. SAWADA,
Institut für gerichtliche Medizin der Universität Gifu,
Tsukasamachi 40