

Aus dem Institut für gerichtliche und soziale Medizin der Universität Kiel  
(Direktor: Prof. Dr. W. HALLERMANN)

## **Eine immunoelektrophoretische Technik mit kombinierten Puffersystemen zur Darstellung der Haptoglobintypen\***

Von

**W. HALLERMANN, M. KIWI und K. H. STÜRNER**

Mit 3 Textabbildungen

*(Eingegangen am 10. August 1963)*

Die Tatsache, daß zuweilen bei verschiedenen Menschen die Identifizierung des Haptoglobintypes trotz einwandfreier Untersuchungs-substrate und einer einwandfreien Technik bei Untersuchungen im Stärke-Gel infolge physiologischer Schwankungen des Haptoglobinspiegels Mühe bereiten kann, hat uns veranlaßt, technische Möglichkeiten zu überprüfen, den Haptoglobintyp durch die Immunelektrophorese darstellen zu können. Wir glauben, den Vorteil der immunoelektrophoretischen Darstellung darin sehen zu müssen, daß die Immunelektrophorese im Gegensatz zur Stärke-Gel-Elektrophorese nicht an eine über 20 mg-% liegende Haptoglobinkonzentration im Serum (KAHLICH-KOENNER u. WEIPPL) gebunden ist und die Immunelektrophorese es gestattet, bei der Darstellung auf den Hämoglobin-Haptoglobinkomplex zu verzichten. Die bisherigen Untersuchungen in dieser Richtung durch HIRSCHFELD sowie durch ALY, BRINKER, CLEVE, DEICHER, HARTMANN und NIX geben zwar Aufschlüsse über die technischen Möglichkeiten, jedoch haben PROKOP und BUNDSCHUH darauf hingewiesen, daß die Haptoglobindarstellung der Typen 2—1 und 2—2 mittels Präcipitationsmethoden und durch die Immunelektrophorese nicht zuverlässig sei. HIRSCHFELD hat sowohl reine Seren als auch Seren mit Hämoglobinzusatz aufgetrennt und gezeigt, daß in der Immunelektrophorese der Hämoglobin-Haptoglobin-Komplex langsamer wandert als die Haptoglobinfractionen allein; er hat in mehreren Publikationen fernerhin darauf verwiesen, daß der Hp 1—1-Typ ein elektrophoretisch anodisch schneller wanderndes Präcipitat ergibt als der Hp 2—2-Typ und der Hp 2—1-Typ, der eine intermediäre Lage einnimmt. Die Untersuchungen von ALY u. Mitarb. unter Verwendung eines Michaelispuffers ( $p_H$  8,2) unter Hervorhebung der Präcipitationsmethoden stellen zwar technische Vereinfachungen dar, jedoch wird

---

\* Die Untersuchungen wurden mit Mitteln der Deutschen Forschungsgemeinschaft durchgeführt.

hinsichtlich der Technik von HIRSCHFELD keine so weitreichende Auftrennung erzielt.

In den eigenen Untersuchungen haben wir die von HIRSCHFELD angegebene Technik an Seren bekannter Haptoglobintypen ohne Hämoglobinzusatz überprüft. Nachdem H. CARSTENSEN auf die gute Verwendbarkeit von Glykokollpuffer für die Immunoelektrophorese hingewiesen hatte, gelang es uns, ein Puffersystem zu entwickeln, das es gestattet, auch immunoelektrophoretisch die Haptoglobintypen einwandfrei darzustellen.

*I. Technik nach HIRSCHFELD.* Reinagar wurde mit einem von HIRSCHFELD angegebenen Veronal-Calciumlactat-Puffersystem erhitzt und auf Objektträger verbracht. Anschließend wurden die Startlöcher (Durchmesser 3,5 mm) ausgehoben und mit Serum bekannter Haptoglobintypen beschickt. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte bei 130—150 V und 50 mA über 4 Std in einer feuchten Kammer. Als Energiequelle wurde das stabilisierte Netzgerät 6007 der Fa. Grundig benutzt. Nach der Auftrennung wurde der Antikörperkanal (60 × 4 mm) ausgehoben und mit Nabelschnurserum, das in der Stärke-Gel-Elektrophorese keinen Haptoglobintyp zeigte, gefüllt. Nach 30 min Diffusionszeit im Brutschrank bei 37°C wurde der Antikörperkanal vorsichtig von Resten des Nabelschnurserums mit Filtrierpapier ausgetupft und mit einem handelsüblichen polyvalenten Antihumanserum gefüllt, von dem bekannt war, daß es über einen starken Anti-Haptoglobinanteil verfügte. Zur Diffusion wurden die Objektträger in einer feuchten Kammer 20 Std lang in einen Brutschrank (37°C) verbracht. Nach der Diffusion wurden die Objektträger 30 Std lang in physiologische Kochsalzlösung gelegt und anschließend zwischen Filterpapier getrocknet. Hiernach erfolgte Fixierung der Präcipitate durch 2%ige Essigsäure, Anfärbung mit Amido-Schwarz 10 B und Entfärbung in einem Essigsäure-Methanol-Gemisch.

*II. Immunoelektrophorese mit Glykokoll-NaOH-Puffer nach SÖRENSEN.* Pufferlösungen:

Lösung A: 7,505 g Glykokoll  
5,85 g NaCl  
in 1000 ml Aqua dest.

Lösung B: 0,1 n NaOH

Um den Puffer auf einen  $p_H$ -Wert von 10,0 einzustellen, wurden 62,5 ml der Lösung A mit 37,5 ml der Lösung B zusammengebracht (Ionenstärke 0,15). Nach Einstellung des  $p_H$ -Wertes von 10,0 wurde die Ionenstärke durch Verdünnung mit destilliertem Wasser auf 0,05 gebracht. Reinagar wurde mit Glykokoll-NaOH-Puffer erhitzt und auf Objektträger mittels einer Pipette aufgetragen. Im übrigen wurde wie bei der Technik nach HIRSCHFELD verfahren. An den Elektroden wurde der von HIRSCHFELD angegebene Puffer verwendet.

*III. Kombiniertes Puffersystem.* 12,5 ml des von HIRSCHFELD angegebenen Gelpuffers (Ionenstärke 0,05) wurden mit 12,5 ml Glykokoll-NaOH-Puffer (Ionenstärke 0,05) gemischt und mit 0,5 g Reinagar in einem Glaskolben im Wasserbad erhitzt. Das Puffergemisch hatte einen  $p_H$ -Wert von 9,2. In diesem Gel wurden die Seren bei 130—150 V und 50 mA 4 Std lang aufgetrennt. Nach der Absorption mit Nabelschnurserum und Diffusion gegen ein anti-haptoglobinhaltiges Anti-Humanserum wurden die Objektträger 30 Std in physiologischer Kochsalzlösung gewaschen,

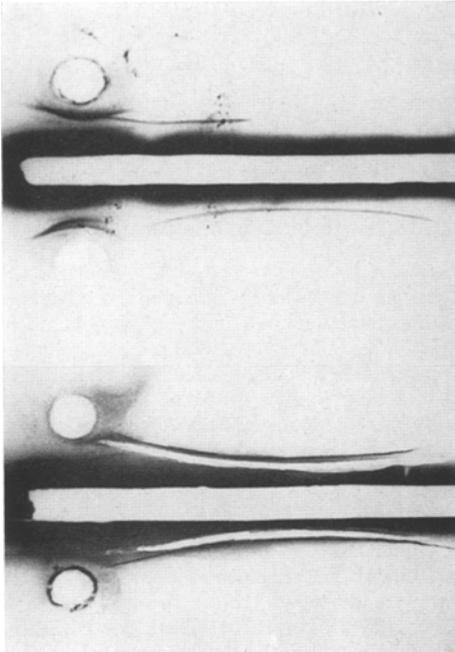


Abb. 1. Veronal-Calciumlactat-Puffer.  $p_H$  8,6. Von oben nach unten: Hp 2—2, Hp 2—1, Hp 2—1 und Hp 1—1. Hp 1—1 und Hp 2—1 lassen sich kaum voneinander unterscheiden

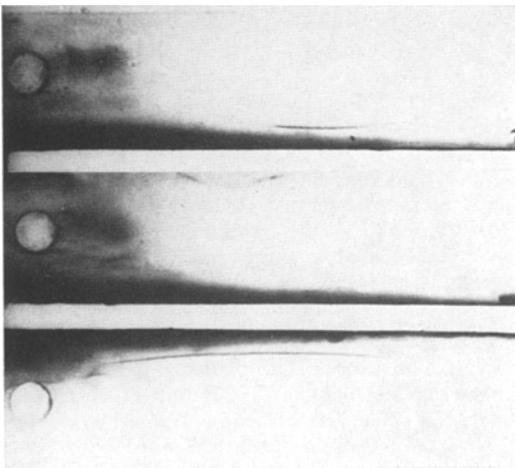


Abb. 2. Glykokoll-NaOH-Puffer ( $p_H$  10,0). Von oben nach unten: Hp 1—1, Hp 2—2 und Hp 2—1. Der Typ Hp 2—2 stellt sich nicht dar

getrocknet und 5 min in 2%iger Essigsäure fixiert. Die Färbung erfolgte 9 min lang in folgender Lösung:

Amido-Schwarz 10 B . . .	1 g
Essigsäure . . . . .	100 ml
Methanol . . . . .	700 ml
Aqua dest. . . . .	200 ml

Anschließend wurde mit folgendem Ansatz 10—15 min lang entfärbt:

Essigsäure . . . . .	100 ml
Methanol . . . . .	700 ml
Aqua dest. . . . .	200 ml

Bei unseren immunoelektrophoretischen Untersuchungen mit verschiedenen Puffersystemen hat sich gezeigt, daß die Darstellung der einzelnen Haptoglobintypen recht unterschiedlich erfolgt. Wenn man von der immunbiologischen Seite absieht — es sind genügend handelsübliche Anti-Human-Seren mit starken Anti-Haptoglobin-Anteilen erhältlich —, so

scheint für die klare und differente Darstellung der Haptoglobine die elektrophoretische Auftrennung von entscheidender Bedeutung zu sein. Wir haben daher die Seren 4 Std bei 130 bis 150 V und 50 mA aufgetrennt. Unter diesen optimalen Bedingungen ist kaum eine Austrocknung des Gels erfolgt, und die Präcipitate waren deutlich abzulesen. Neben den elektrophoretischen Ver-

hältnissen, die sich aus Stromstärke und Ionenkonzentration im Gel ergeben, ist des weiteren in Analogie mit den von PROKOP und BUNDSCHUH beschriebenen Verhältnissen in der Stärke-Gel-Elektrophorese auch für die Immunelektrophorese der  $p_H$ -Wert der benutzten Puffersysteme von tragender Bedeutung. Wie aus Abb. 1 hervorgeht, stellen sich mit dem Veronal-Calciumlactat-Puffer bei einem  $p_H$ -Wert von 8,6 zwar alle drei Haptoglobintypen dar, jedoch ist es schwierig, die Typen Hp 1—1 und Hp 2—1 zu unterscheiden.

Bei Auftrennung verschiedener Seren in einem Agargel mit Glykokoll-NaOH-Puffer ( $p_H$  10,0) stellten sich der Hp 1—1- und der Hp 2—1-Typ deutlich unterscheidbar dar. Der Hp 1—1-Typ besteht aus einem weit anodenwärts gelegenen Präcipitat, während der Typ Hp 2—1 eine Position einnimmt, die kurz hinter dem Startloch beginnt und bis in die Gegend des Hp 1—1-Typs reicht. Der Hp 2—2-Typ ist jedoch bei Unter-

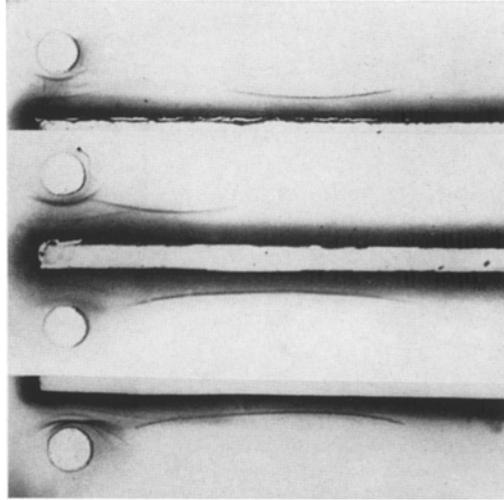


Abb. 3. Veronal-Calciumlactat-Glykokoll-NaOH-Puffergemisch ( $p_H$  9,2). Von oben nach unten: Hp 1—1, Hp 2—2, Hp 2—1. Ganz unten eine Mischung von Hp 1—1 und Hp 2—2 zu gleichen Teilen

suchungen in diesem Puffergemisch entweder gar nicht zu erkennen oder höchstens als schwaches Präcipitat angedeutet.

Durch Mischung des Veronal-Calciumlactat-Puffers mit dem Glykokoll-NaOH-Puffer zu gleichen Teilen erhält man ein Puffersystem von  $p_H$  9,2. Bei Verwendung dieses Puffersystems stellen sich alle drei Haptoglobintypen mit deutlichen unterschiedlichen Positionen dar. Der Typ Hp 1—1 besitzt eine weit anodenwärts gelegene Position, während der Typ Hp 2—2 als Präcipitat nahe am Startloch auszumachen ist. Der Hp-Typ 2—1 erstreckt sich von der Hp 2—2-Position bis zur Hp 1—1-Position. Eine Mischung von Seren des Hp-Typs 1—1 und 2—2 zu gleichen Teilen ergab immunoelektrophoretisch eine Position, die der des Hp-Typs 2—1 entsprach.

Immunelektrophoretische Untersuchungen an Seren von drei gesunden Personen, die dem Hp-Typ 1—1, 2—1 und 2—2 zugehörten, ergaben über 6 Wochen immer gleichbleibend gut verwertbare Ergebnisse.

100 Seren von gesunden Personen, deren Haptoglobin-Typ durch Untersuchungen im Stärke-Gel bestimmt worden waren, zeigten mit diesem Puffergemisch auch in der Immunelektrophorese übereinstimmende und gut ablesbare Haptoglobintypen. Von den 100 untersuchten Personen gehörten 16 dem Hp-Typ 1—1, 50 dem Hp-Typ 2—1 und 34 dem Hp-Typ 2—2 an. Die Verteilung entsprach im wesentlichen der von STÜRNER und CHRISTEN für Schleswig-Holstein festgestellten Frequenz.

### *Zusammenfassung*

In Anlehnung an die von HIRSCHFELD modifizierte immunoelektrophoretische Technik wird ein Puffergemisch (Veronal-Calciumlactat und Glykokoll-NaOH) angegeben, mit dem es möglich ist, Haptoglobintypen bei einem im Puffer gemessenen  $p_H$ -Wert von 9,2 immunoelektrophoretisch einwandfrei darzustellen.

### **Literatur**

- ALY, F. W., G. BRINKER, H. CLEVE, H. DEICHER, F. HARTMANN u. W. NIX: Die Bestimmung der Haptoglobin-Gruppen mit Hilfe einfacher immunologischer Methoden. *Klin. Wschr.* **39**, 610 (1961).
- CARSTENSEN, H.: Inaug.-Diss. (in Bearbeitung).
- HIRSCHFELD, J.: Immunelectrophoresis-procedure and application to the study of group-specific variations in sera. *Sci. Tools* **7**, 2, 18 (1960).
- Characterization of precipitating components in normal human sera obtained by an immuno-electrophoretic technique. *Acta path. microbiol. scand.* **49**, 2, 225 (1960).
- KAHLICH-KOENNER, D. M., u. G. WEIPPL: Abhängigkeit der Haptoglobintypenbestimmung von der Haptoglobin-Konzentration. *Klin. Wschr.* **39**, 1025 (1961).
- PROKOP, O., u. G. BUNDSCHUH: Die Technik und die Bedeutung der Haptoglobine und Gm-Gruppen in Klinik und Gerichtsmedizin. Berlin: W. de Gruyter & Co. 1963.
- STÜRNER, K. H., u. H. CHRISTEN: Die Verteilung der Haptoglobin-Typen in Schleswig-Holstein. *Schlesw.-Holst. Ärztebl.* **14**, 11 (1961).

Prof. Dr. W. HALLERMANN,  
Direktor des Instituts für gerichtliche Medizin der Universität Kiel,  
Hospitalstr. 42