

Die Variante C₅ der Cholinesterasen des Serums

Experimentelle Untersuchungen über Mikromethoden der Gelelektrophorese

H. KLEIN, K. GÄRTNER und R. GÜNTHER

Aus der Abteilung für Verkehrsmedizin des Instituts für gerichtliche Medizin
der Universität Heidelberg (Prof. Dr. H. KLEIN)

Eingegangen am 15. Januar 1967

Die Zonenelektrophorese zur Trennung von Proteinen erhielt durch SMITHIES (1955) neue Anregungen. Mit der inzwischen vielfach verbesserten Methode der Stärkegelelektrophorese können über 18 verschiedene Proteine des Serums getrennt werden. Für spezielle Zwecke, vor allem für die Spurenanalyse, hat die horizontale und vertikale Stärkegelelektrophorese in ihrer üblichen Durchführung — schon infolge der Schichtdicke — verschiedene Nachteile. In den nachstehenden Untersuchungen wird über Versuche zur Entwicklung einer Mikromethode der Gelelektrophorese unter zwei Bedingungen berichtet: 1. Die Methode sollte, ebenso aufschlußreich wie die übliche Elektrophorese, für die in der Spurenanalyse meist geringen Serumengen geeignet sein; 2. neben der üblichen Trennung der Proteine sollte auch die Darstellung der Serumfermente, vor allem der Esterasen mit histochemischen Mitteln, möglich sein.

I. Methodische Untersuchungen

1. Bisher beschriebene Mikromethoden

Bei Durchsicht des Schrifttums finden sich verhältnismäßig wenige Angaben über Mikromethoden der Gelelektrophorese. Für die Stärkegelelektrophorese gaben im wesentlichen BAUR (1963) sowie MARSH, JOLLIFF und PAYNE (1964) ausführlichere Beschreibungen. In den letzten Jahren hat die Acrylamidelektrophorese in Säulen mehr Beachtung gefunden. ALLEN, POPP und MOORE (1965) und AKROYD (1965) haben in diesem Zusammenhang auf die Möglichkeit einer Mikromethode hingewiesen.

BAUR (1963) verwendet üblich hydrolysierte Stärke nach SMITHIES und Puffer verschiedener Zusammensetzungen, führt die Serum- oder Hämoglobinelektrophorese in Borat- oder im diskontinuierlichen Puffersystem durch, zur Gelbereitung wird eine höhere Molarkonzentration gewählt als von SMITHIES (1959). Als Unterlage werden verwendet 80 F Cellulose und 124 D Cellophanplatten 30,5:30,5 cm. Die Schichtdicke beträgt 1 mm. Die Serumproben werden mit Filterpapierstreifen aufgetragen, die Serummenge beträgt 5 μ l. Die Elektrophorese findet in einer Kammer bei 4—5 Volt/1 cm statt. Die Dauer der Elektrophorese beträgt 20 bis 22 Std. Nach der Elektrophorese werden die Scheiben in 4 min in reinem Methanol

gehärtet, 30 min in eine 15% Glycerin und 2% Eisessiglösung gegeben, mit Heißluft getrocknet, anschließend mit Amidoschwarz gefärbt. Nach den Abbildungen lassen sich die Ergebnisse keineswegs mit der üblichen Stärkegelelektrophorese vergleichen, doch dürfte der Vorteil darin liegen, daß die gehärteten und durchsichtigen Scheiben sich photometrisch auswerten lassen.

MARSH, JOLLIFF und PAYNE (1964) benutzten ein 13,3%-Gel in einem Trispuffer von pH 8,8, in den Trögen ein Boratpuffer mit pH 8,2. Das Gel wird in 3 mm dicke Rinnen einer besonderen Elektrophoreseapparatur gegossen, als Brücke zu den Trögen schweres Filterpapier benutzt, die Serumproben werden mit Filterpapier aufgetragen, die Elektrophorese mit einem Gleichstrom von 50 mA/200 Volt durchgeführt. Die Trennstrecke beträgt 4,5—5 cm. Eine Zeitangabe über die Trenndauer wird nicht gemacht. Die Proteine werden mit Amidoschwarz, histochemisch Enzyme, Haptoglobine mit Benzidin gefärbt.

Über Mikromethoden mit Acrylamidgel liegen neben einzelnen Hinweisen zwei ausführlichere Beschreibungen vor. ALLEN, POPP und MOORE (1965) führen die Elektrophorese in senkrecht angeordneten 8 cm hohen und 0,5 cm weiten Glasröhrchen durch. Auf eine 4,5 cm hohe 8,5%-Acrylamidsäule werden 200 μ l eines 3,95% -Acrylamidgels gleicher Zusammensetzung, auf dieses 100 ml einer Plasmasaccharose-Lösung gegeben. Den Abschluß nach oben bildet eine weitere Schicht von 5% Acrylamidgel. Für den oberen Abschluß werden verschiedene weitere Angaben gemacht. In vorliegendem Zusammenhang ist von Interesse, daß die Plasma- und Serummengen für Plasma zwischen 10—15 μ l, für Serum zwischen 7,5—10 μ l schwanken. Neben Acrylamid und N,N-Methylen-Acrylamid enthält das Gel Triphosphatpuffer mit einem pH von 6,9 sowie einer im einzelnen je nach dem Untersuchungsobjekt schwankenden Riboflavinlösung. Der Puffer an den Elektroden ist ein Trisglycinpuffer pH 8,9. Eine eingehendere Beschreibung der Apparatur wird nicht angegeben, ein Hinweis über den Gebrauch der benutzten Katalysatoren fehlt. Die Dauer der Elektrophorese beträgt 1 Std bei 3 mA je Röhrchen, die Laufstrecke 2,54 cm. Nach Beendigung der Elektrophorese werden die Acrylamidzylinder in Eiswasser ausgedrückt, 5 min in eine Tris-Chloridpufferlösung pH 7,1 eingelegt und anschließend entweder mit Amidoschwarz — die Serumesterase nach MARKERT und HUNTER (1959) — gefärbt. Eine einfachere Methode hat AKROYD (1965) angegeben. Die Trennung von Beta-Lactoglobulin erfolgt in einem Acrylamidgel 11% mit einem Trispuffer pH 8,6. Der wesentliche Unterschied in der Methode von ALLEN, POPP und MOORE (1965) beruht darauf, daß keine Unterteilung in mittlere, obere und Trägerschicht erfolgt. Die ProbeLösung wird durch einen Zusatz von 10% Saccharoselösung gefestigt, die Laufstrecke mit Bromphenolblau markiert. Die Laufzeit beträgt 1 Std, die Stromstärke 4 mA je Röhrchen. Die Entfärbung erfolgt elektrolytisch.

2. Eigene methodische Untersuchungen

a) *Untersuchungen mit einer Stärkegel-Dünnschicht.* Nach vielfachen Versuchen erwies sich ein Gel aus 10% Stärke in einem Trispuffergemisch von pH 8,8 folgender Zusammensetzung für alle Trennungen in dünnen Schichten am geeignetsten: 152 cm³ Trispuffer 1 m (121,14 g Tris auf 1000 Aqua dest.) zu 848 cm³ Aqua dest. und 100 cm³ Citronensäure 6,1 m (21,01 g Citronensäure auf 100 g Aqua dest.) zu 900 cm³ Aqua dest. In den Trögen wurde ein Trispuffer gleicher Zusammensetzung verwendet sowie ein Boratpuffer mit folgender Zusammensetzung: 500 cm³ Borsäure 0,6 m + 60 cm³ Natronlauge 1 m + 440 cm³

Aqua dest. Zu 100 cm³ Trispuffergemisch werden 10 g hydrolysierter Stärke gekocht, entlüftet, das heiße Stärkegel auf den Träger in einer Schichtdicke von etwa 2 mm aufgegossen und abgekühlt. Als Träger wurden versucht: Objektträger in offener Kammer (a₁), Filterkartonstreifen (a₂), Astralonfolien (a₃) und Glasplatten in geschlossener Kammer (a₄). Die Färbung erfolgt wie üblich mit Amidoschwarz durch ein Gemisch aus 1000 cm³ Methanol, 200 cm³ Eisessig und 800 cm³ Aqua dest. Die mit Supracenviolett gefärbten Schichten wurden in 1—3% Essigsäure gehärtet und entfärbt. Die Mikromethoden a₁ bis a₃ erwiesen sich als weniger geeignet; sie sollen nur kurz erwähnt werden.

a₁) *Objektträger mit offener Kammer.* Die Objektträger wurden in einen üblichen Immunelektrophoreserahmen eingepaßt, das flüssige Stärkegel so eingegossen, daß die Schicht sich kaum oberhalb des Randes der Objektträger erhob, höchstens die Hälfte der Objektträgerdicke erreichte. Nach Erstarren des Gels wurde mit einer 5 mm breiten Tuschfeder das Serum eingestanzt. Bei 10 mA und 350 Volt wurde eine Laufstrecke in der gesamten Objektträgerlänge von 4,5 cm in 3 Std erreicht. Es erwies sich, daß die sehr dünne Gelschicht keine klaren Trennungen, mindestens nicht in Schärfe und Zahl wie die Makromethode ermöglichte. Die Grenzen zwischen den einzelnen Proteinen waren unscharf. Eine weitere Schwierigkeit bestand darin, daß beim Färben und Entfärben die dünne Schicht sich leicht von dem Objektträger löste und einriß. Nach vielfachen Modifikationen dieser Methode mußte sie, trotz der Möglichkeit, mit sehr geringen Serummengen zu befriedigenden Trennungen zu kommen, aufgegeben werden.

a₂) *Filterkartonstreifen.* Die 5:15 cm großen Filterkartonstreifen wurden mit einem dünnen Stärkegel beschichtet und die Serumproben ebenfalls mit einer Tuschfeder eingebracht. Da die Streifenenden ohne Brücke in die Tröge gehängt werden konnten, war die Stärkeschicht in direktem Kontakt mit der Pufferlösung. Es wurden 8 mA/380 Volt benötigt für eine Laufstrecke von 4 cm in einem Trispuffer während einer Zeit von etwa 3 Std. Die weitere Bearbeitung erfolgte wie angegeben. Die Methode ist einfach, hat den Vorteil, daß die Stärkeschicht sich nicht von dem Filterkarton löst, jedoch den Nachteil, daß neben einem nicht immer bestimmbaren Streckenlauf die Trennungen undeutlicher sind und gewissermaßen eine Überlagerung zwischen zwei Methoden ergaben: Stärkegel und Papierlektrophorese. Wenn dieser Nachteil zu vermeiden versucht wurde, mußten die Stärkeschichten so erhöht werden, daß schließlich kein wesentlicher Unterschied mehr zur Makromethode vorhanden war.

a₃) *Stärkegel auf Astralonfolien.* Die Versuche wurden sowohl in horizontaler wie in vertikaler Anordnung durchgeführt. Bei 15 mA und 220 Volt wurde in 30 min eine Laufstrecke von 4,5 cm erreicht. Die Trennungen waren sowohl in horizontaler wie in vertikaler Anordnung nicht besser als in den vorerwähnten Versuchen. Die verschiedenen Schwierigkeiten, die bei diesen Versuchen auftreten, würden eine eingehende theoretische Überlegung unter chemisch-physikalischen Gesichtspunkten erfordern, wobei nicht nur die Schichtdicke von Bedeutung sein dürfte, sondern die Temperaturdifferenzen zwischen Gel und Trägerschicht. Die recht komplizierten Verhältnisse — die weit in theoretische Überlegungen der Elektrophorese überhaupt hineinführen würden — überschreiten jedoch den Rahmen dieser unter praktischen Gesichtspunkten gestellten Untersuchungen.

a₄) *Stärkegel auf Glasplatten in geschlossener Kammer.* Die Versuchsanordnung ist in Abb. 1 wiedergegeben. Die Schichtdicke beträgt 2 mm,

ein zweites Gel aus 10 g hydrolysiertes Stärke und 100 cm³ eines Boratpuffers (500 cm³ Borsäure 0,6 m + 60 cm³ Natronlauge 1 N + 440 cm³ Aqua dest.) wird entsprechend Abb. 1 in Behälter b eingefüllt. Die Serumproben werden mit 5:8 mm großen Filterpapierstreifen eingesetzt, die Kammern mit Trispuffer gefüllt: 6 mA/90 Volt. Nach 10 bis

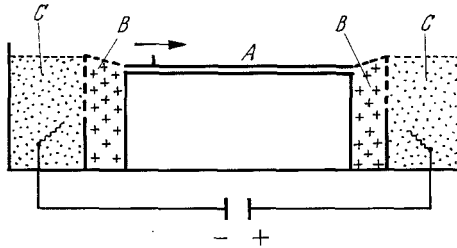


Abb. 1. Stärkegel auf Glasplatte in geschlossener Kammer. A Abgedeckte Glasplatte mit 2 mm Gelschicht; B Gelblock aus Boratpuffer; C flüssiger Trispuffer

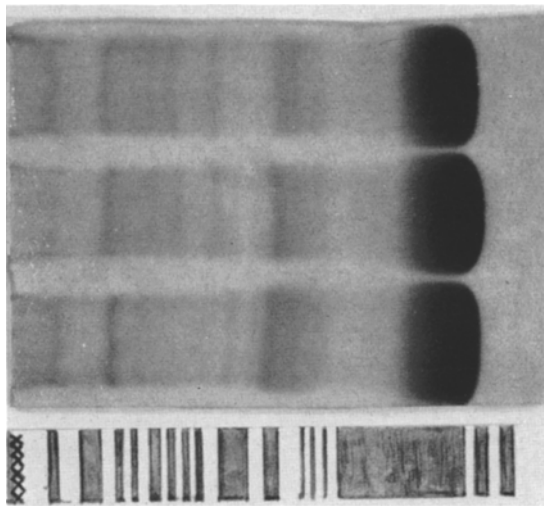


Abb. 2. Mikromethode: Trennung von drei verschiedenen Serumproben. Schema: Auftrennung mit üblicher Mikromethode

15 min werden die Filterpapierstreifen entfernt, die Stärke mit Cellophanpapier abgedeckt. Nach 2 Std wird bei einer Laufstrecke von 5 cm die Elektrophorese unterbrochen. Die Färbung der Platten erfolgt wie üblich.

Diese Methode brachte mit der üblichen Makromethode vergleichbare Ergebnisse. In Abb. 2 ist eine Elektrophorese mit einer Serummenge von 1—1,5 µl wiedergegeben. Unter den gegebenen Bedingungen muß die Trennung als ausreichend bezeichnet werden. Die Färbung mit Amidoschwarz oder, für die Bestimmung der Hp-Typen, mit Benzidin

ist besser als die mit Supracenviolett. Ein weiterer Vorteil ist die einfache Handhabung und der geringe Zeitaufwand. Die dünne Schicht ist so zu härten, daß sie photometrisch ausgewertet werden kann.

b) *Mikromethoden mit Acrylamidgel.* Acrylamid ist eine synthetische Substanz der Formel C₃H₅N und dem Molekulargewicht 71,1. Das Gel besteht aus dreidimensional angeordneten linearen Ketten von Kohlenwasserstoffen, die mittels Mythylbrücken miteinander in Verbindung stehen und durch Amidgruppen hydrophile Eigenschaften haben. Das

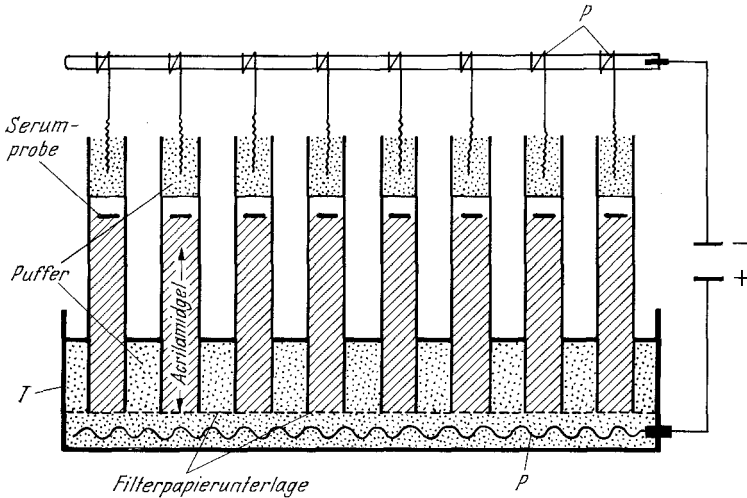


Abb. 3. Acrylamid. Mikromethode. Kammer für acht Trennungen.
Einzelheiten im Text

Gel kann durch einen Katalysator mit den verschiedensten Puffern eines weiten pH-Bereiches bereitet werden und bildet eine formbare und elastische, farblos transparente Masse, die, verglichen mit einem Stärkegel, leichter und vielseitiger bearbeitet werden kann.

Es wurde ein 5%-Gel bereitet in Trispuffer (Hydroxymethylaminomethan) 1 m pH = 8,8 152 cm³ Trispuffer 1 m = 121,14 g Tris zu 1000 Aqua dest. zu 848 cm³ Aqua dest. und 100 cm³ Citronensäure 0,1 m (21,01 g Citronensäure ad 1000 cm³ Aqua dest.). Der in den Trögen verwendete Boratpuffer pH 8,6 hatte die Zusammensetzung: Borsäure 0,6 m 500 cm³ + Natronlauge in 60 cm³ + 440 cm³ Aqua dest. 5 g Acrylamid und 250 g N,N-Methylen-bis-acrylamid (MG = 154,2) werden in 100 cm³ des Trispuffers gelöst und gefiltert. Als Indikator wird jeweils 1 cm³ einer frisch bereiteten 10%-Lösung von Dimethylaminopropionitrit (DMAPN) und einer gleichfalls frischen 10%-Lösung von Ammoniumpersulfat hinzugegeben. Dieses Gemisch wird unter Vermeidung von Luftbläschen in 6 cm hoher Säule in 8 cm lange und 0,8 cm weite Kunststoffröhrchen gefüllt. Das Gel ist in etwa 3 Std erstarrt. Dies kann beschleunigt werden, indem die Röhrchen in ein Wasserbad von 60° gestellt werden. Es ist möglich, die Röhrchen mit Paraffin zu verschließen und über einen Monat bis zur Verwendung aufzubewahren.

Die Durchführung der vertikalen Elektrophorese ist in Abb. 3 wiedergegeben. Das mit physiologischer Kochsalzlösung 1:2 verdünnte Serum wird auf ein

Filterpapierplättchen gegeben und mit drei Tropfen einer kalt angerührten Suspension hydrolysiertes Stärke in Boratpuffer pH = 8,6 abgedeckt, Gleichstrom 10—15 mA/100—150 Volt. Bei einer Laufzeit von 1 Std ergibt sich unter diesen Bedingungen eine Laufstrecke von 4,5 cm. Der Lauf der Elektrophorese wird sichtbar, wenn das mit Serum getränkte Filterpapierplättchen eine Spur von Bromphenolblau enthält.

Die Serumproteine konnten mit der beschriebenen Methode konstant in 8—9 einzelnen Trennungen nachgewiesen werden. Die Esterasen wurden bei Trispuffer pH 6,0 im Gel, Boratpuffer pH 6,0 an den Elektroden mit der *a*-Naphthylacetat-Färbung von MARKERT und HUNTER (1959) nachgewiesen: 100 mg *a*-Naphthylacetat werden in 10 cm³ Aceton gelöst, zu 10 cm³ Phosphatpufferlösung pH 7,4 (6,8 g KH₂PO₄ ad 500 cm³ Aqua dest. + 8,9 g Na₂HPO₄·2H₂O ad 500 cm³ Aqua dest.) werden 1 cm³ dieser Lösung gegeben und mit 50 mg Fast Red TR-Salt (George T. Gurr, London) gemischt und sofort über die Zylinder gegossen. Nach dem Anfärben, im allgemeinen nach 10 min abgeschlossen, werden die Präparate noch 20—30 min in den benutzten Trispuffer, anschließend zur Fixation in 50% Methanol gebracht.

II. Praktische Anwendung

Die Variante C₅ der Cholinesterasen des Serums

Der gegenwärtige Stand der Kenntnis über die Genetik der Cholinesterasen des menschlichen Serums wurde von LEHMAN und LIDDELL (1964) ausführlich dargestellt. Eine gewisse Erweiterung der dort gegebenen Einzelheiten kann in den Untersuchungen von GOEDDE und FUSS (1964) sowie GOEDDE, FUSS, BAITSCH und RITTER (1965) gesehen werden. Eine kurze Übersicht hat MOTULSKY (1964) gegeben. Eine einheitliche Bezeichnung der Geno- und Phänotypen besteht noch nicht. Die von MOTULSKY (1964, Tabelle 2) angegebene dürfte mindestens als übersichtlich bezeichnet werden können. Wieweit die von BAITSCH (1965) vorgeschlagene Bezeichnung sich durchsetzen wird — die Nomenklatur ist weitgehend identisch mit der von MOTULSKY (1964) — ist noch nicht zu übersehen.

HARRIS, HOPKINSON, ROBSON und WHITTAKER (1963) machten darauf aufmerksam, daß in der Stärkegelelektrophorese nach SMITHIES und POULIK (1957) in der Regel vier einzelne Cholinesterasen sich nachweisen lassen. Diese wurden mit C₁ bis C₄ bezeichnet. C₁, C₂ und C₃ sind die am schnellsten wandernden Fraktionen in der Stärkegelelektrophorese und in der Regel schmaler und weniger dicht als C₄ (Abb. 4). Neben C₁ bis C₄ wurde gelegentlich eine weitere scharf sich abtrennende Esterase mit der Alphanaphthylacetat-Methode nachgewiesen. Diese Esterase wandert etwas langsamer als C₄, entspricht in der Regel sowohl in der Dichtigkeit nach der Alphanaphthylacetat-Methode wie in

ihrer Ausdehnung jedoch der von C₄. Da sie, einmal nachgewiesen, immer wieder, auch über Jahre, vorhanden war, konnte es sich nicht um eine zufällige Variation handeln. Unter 248 Bestimmungen wurde sie in nur 13 Fällen nachgewiesen. Die Häufigkeit scheint zu schwanken. HARRIS u. Mitarb. (1963) fanden sie unter 213 Einwohnern der Tristan da Cunha-Insel in 36 Fällen. Da beide Stichproben annähernd gleichgroß sind, dürfte die Differenz zwischen 5 und 17% von Bedeutung sein. Nach der Bestimmung von KALOW und GENEST (Einzelheiten: LEHMANN und LIDDELL, 1964) unterscheiden sich die Seren mit der Variation C₅ nicht von dem am häufigsten vorkommenden Cholinesterase-Typus E^{1u}E^{1u} (MOTULSKY, 1964). Über die genetischen Beziehungen der Variation C₅ ist hier nicht zu berichten. Die Stichprobe von HARRIS u. Mitarb. (1963) dürfte noch zu klein sein. Während in den einzelnen Stichproben die Häufigkeit zu schwanken scheint, weitere Untersuchungen kaum vorliegen, scheint es bemerkenswert, daß HORSFALL, LEHMAN und DAVIES (1963) unter 104 australischen Proben den Typus E^{1u}E^{1u}C₅ nicht feststellen konnten.

Mit den hier beschriebenen Mikromethoden wurden eine größere Reihe von Serumproben auch mit der Alphanaphthylacetat-Methode auf die Anwesenheit von C₁ bis C₄ und C₅ der Cholinesterasen des Serums geprüft. Die Formen C₁ bis C₄ konnten mit der Stärkegelelektrophorese — auch mit der Mikromethode auf Glasplatte in geschlossener Kammer und einem diskontinuierlichen Puffersystem und mit der Acrylamidgelmethode — festgestellt werden. Wenn neben C₁ bis C₄ eine weitere vorhanden war — es wurde zunächst nur Serum gesunder Personen untersucht — wurde in der zu erwartenden Häufigkeit auch die Variation C₅ gesehen. Der histochemische Nachweis der Esterase wurde im Prinzip nach den Angaben von MARKERT und HUNTER (1959) durchgeführt. Zur Differenzierung wurden gleichzeitig Gele mit einem Zusatz von Eserinsulfat 10⁻⁴ M benutzt. Die Variation C₅ ist ebenso wie C₁, C₂ und C₃ eserineempfindlich. In den Blöcken mit Eserinsulfat war keine positive Reaktion zu erreichen. Die Fraktion C₄ zeigte auch im eserinsulfathaltigen Stärkeblock noch eine positive Reaktion. Damit können die Angaben von HARRIS, HOPKINSON, ROBSON und WHITTAKER als bestätigt angesehen werden: Die C₄ Cholinesterase kann in der zweidimensionalen Stärkegelelektrophorese in die Unterfraktionen S 1 und S 2 getrennt werden. Diese Fraktionen, S 1 und S 2 („storage bands“), haben mit der Fraktion C₅ nichts zu tun.

Über die Häufigkeit von C₅ kann gesagt werden, daß unter 770 untersuchten klaren Serumproben die Variation C₅ insgesamt in 30 Proben festgestellt werden konnte. Dies stimmt annähernd mit der bisher bekannten Häufigkeit — die mit etwa 5% angegeben wird — überein. Da gleichzeitig auch nach KALOW und GENEST die Disbucainzahl sowie

die Fluoridresistenz — weitere Untersuchungen: ROHR (1965) — bestimmt wurden, kann vorläufig gesagt werden, daß alle C_5 -Typen zum Genotypus $E^{1^u} E^{1^u}$ nach MOTULSKY (1964) gehören.

In Abb. 4 werden acht Serumproben gezeigt. Die Proben 1 bis 4 stellen den üblichen Typus dar: C_1 , C_2 , C_3 , C_4 . Die Probe 5 und 6 sind zwei C_5 -Varianten eines normalen Serums (auf der Abbildung werden C_1 und C_2 weniger deutlich). Wenn die Probe 5 und 6 im Eserinblock untersucht wurde, zeigte sich, daß C_4 lediglich noch die Ausdehnung

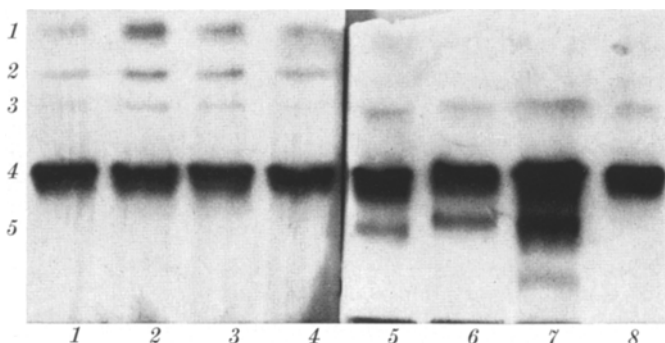


Abb. 4. Acht verschiedene Serumproben. 1—4 üblicher Typ C_1 bis C_4 ; 5 und 7 Variante C_5 ; 6 C_5 Sonderfall; 8 üblicher Typ der Cholinesterasen des Serums

von C_1 hatte. Die Probe 7 zeigt einen Sonderfall: C_5 ist sehr ausgeprägt, außerdem zeigt sich eine weitere Trennung, die bei diesem Serum regelmäßig nachgewiesen werden konnte. Unter 770 Serumproben wurde diese Form nur in einem Falle gefunden. Die Probe 8 ist wiederum zum Vergleich ein üblicher Typus C_1 bis C_4 .

Nach Durchsicht des vorliegenden Schrifttums konnten weitere Untersuchungen über die Variation C_5 der Cholinesterasen des Serums auffallenderweise nicht gefunden werden. SCHEIFFHARTH, GÖTZ und EBERT (1966) haben über Esterase-aktive Fraktionen in verschiedenen menschlichen Organextrakten berichtet, die mit der von URIEL (GRABAR: immunoelektrophoretische Analyse, Amsterdam 1964) angegebenen Methode untersucht wurden. Der histochemische Nachweis wurde mit Beta-Naphthylacetat als Substrat sowie Diazoblau-B als Farbreagenz durchgeführt. Auch mit Betanephthylacetat wurden im Serum gesunder und kranker Personen („wenigstens“) vier Fraktionen, ausschließlich im anodisch gewanderten Proteinbereich, gefunden. Die Elektrophorese wurde auf Agarplatten durchgeführt. Zwischen dem Ergebnis mit beiden Methoden besteht kein Unterschied. Eine der Variante C_5 ähnliche Fraktion wird für Serum nicht erwähnt. Doch wird hervorgehoben, daß in

den Organextrakten bedeutend mehr Esterase-aktive Fraktionen nachgewiesen werden konnten.

Da neben den normalen, frischen oder kurzfristig tiefgekühlten und klaren Seren auch gelegentlich Seren aus Leichen mit verschiedenen Todesursachen untersucht wurden, war aufgefallen, daß in diesen oft bedeutend mehr Esterase-aktive Komponenten nachgewiesen werden konnten. Über Einzelheiten wird später berichtet werden. Der Nachweis vielfacher Esterase-aktiver Komponenten in Organextrakten ist deshalb von Bedeutung, weil damit zu rechnen ist, daß jedes Organ ein eigenes Enzymmuster besitzt.

Zusammenfassung

1. Eine zum Spurennachweis — vor allem von Blut und Geweben — geeignete Mikromethode der Gelelektrophorese müßte zwei Bedingungen erfüllen: a) Die Trennung der Proteine sollte nicht weniger vollständig als in üblicher Gelelektrophorese und, bei Serum, bis zu 1 μ l geeignet sein; b) die Darstellung der wichtigsten Fermente sollte mit in der Histochemie üblichen Methoden, bei Blut und Geweben auch der Nachweis der Esterasen möglich sein.

2. Nach einem Überblick über die bisher bekannten Mikromethoden der Gelelektrophorese wird über Versuche, eine geeignete Methode zu entwickeln, berichtet: a) Es wird eine Dünnschicht-Stärkegelmethode auf Glasplatte in geschlossener Kammer einschließlich weiterer technischer Einzelheiten angegeben; sie erlaubt eine befriedigende Proteintrennung und den Nachweis von Serumfermenten; b) die Nachweisgrenze liegt bei etwa 1 μ l Serum.

3. Es wird über Erfahrungen mit einer vertikalen Mikromethode in einem Äcrylamidgel berichtet.

4. Zur praktischen Erprobung beider Methoden wird über 770 Seren, die nach der histochemischen Methode von MARKERT und HUNTER untersucht wurden, berichtet: a) Es konnten regelmäßig vier eserineempfindliche Esterasen nachgewiesen werden; b) in 30 Seren war die als Variante C 5 bezeichnete eserineempfindliche Esterase nachweisbar.

5. Die beschriebene Mikromethode ermöglicht den Nachweis eserineempfindlicher Esterasen und somit, auf Grund ihres charakteristischen Musters, die Bestimmung von Menschenblut in Spuren bis 1 μ l.

Summary

(1) A gel electrophoretic micro-method suitable for the identification of traces, in particular of blood and tissue, should meet two requirements: (a) protein separation must be as complete as in usual gel electrophoresis and, in the case of serum, practicable to 1 μ lit; (b) indication of the

more important ferments must be possible with usual histochemical methods and, in the case of blood and tissue, even that of the esterases.

(2) Following a survey of the known gel electrophoretic micro-methods, tests to find a suitable method are reported: (a) A method using a thin layer of starch gel on a glass slab in a closed chamber is described including further technical details; protein separation is satisfactory and serum ferments can be identified; (b) the identification limit is about 1 μ lit. of serum.

(3) Experience gained in the use of a vertical micro-method with an acryl amide gel is reported.

(4) More than 770 serums, which were examined by the histochemical method of MARKERT and HUNTER, were used for testing the two methods: (a) Every time 4 eserine-sensitive esterases were identified; (b) in 30 serums the eserine-sensitive esterase known as variant C 5 was identified.

(5) The micro-method described permits the identification of eserine-sensitive esterases and hence, owing to their characteristic features, of human blood in traces of a minimum of 1 μ lit.

Literatur

- AKROYD, P.: Acrylamid-gel electrophoresis of β -Lactoglobulins stored in solution at pH 8.7. *Nature (Lond.)* **208**, 488—499 (1965).
- ALLEN, R. C., R. A. POPP, and D. J. MOORE: Separation and relative quantitation of mouse plasma esterases with disc electrophoresis. *J. Histochem. Cytochem.* **13**, 249 (1965).
- BAUR, E. W.: Thin layer starch-gel electrophoresis and plastification method. *J. Lab. clin. Med.* **61**, 166—173 (1963).
- GÖBDE, H. W., u. W. FUSS: Untersuchungen zur Phylogenetik der Pseudocholinesterasen. *Humangenetik* **1**, 126—140 (1964).
- — H. RITTER u. H. BATTSCH: Über die Verwendung des Pseudocholinesterase-Polymorphismus im Paternitätsgutachten. *Humangenetik* **1**, 311—318 (1965).
- GRABAR, P., u. P. BURTTIN: *Immunelektrophoretische Analyse*. Amsterdam 1964.
- HARRIS, H., D. A. HOPKINSON, E. B. ROBSON, and M. WHITTAKER: Genetical studies on a new variant of serum cholinesterase detected by electrophoresis. *Ann. hum. Genet.* **26**, 359—382 (1963).
- HORSFALL, W. R., H. LEHMANN, and D. DAVIES: Incidence of pseudo-cholinesterase variants in Australian aborigines. *Nature (Lond.)* **199**, 115 (1963).
- KLEIN, H.: Haptoglobin: Grundlagen, Probleme, Erfahrungen. *Dtsch. Z. ges. gerichtl. Med.* **51**, 455—463 (1961).
- , u. F. KNÜCHEL: Papierlektrophoretische Bestimmung der Haptoglobingruppen des Menschen. *Dtsch. Z. ges. gerichtl. Med.* **50**, 278—286 (1960).
- KUNKEL, H. G., and R. J. SLATER: Zone electrophoresis in a starch supporting medium. *Proc. Soc. exp. Biol. (N.Y.)* **80**, 42—44 (1952).
- LEHMANN, H., and J. LIDDELL: Genetical variants of human serum pseudo-cholinesterase. *Progress in medical genetics*, vol. III, p. 75—105. London 1964.
- MARKERT, C. L., and R. L. HUNTER: The distribution of esterases in mouse tissues. *J. Histochem. Cytochem.* **7**, 251—255 (1959).

- MARSH, C. L., C. R. JOLLIFF, and L. C. PAYNE: A rapid micromethod for starch-gel electrophoresis. *Amer. J. clin. Path.* **41**, 217—223 (1964).
- MOTULSKY, A. G.: Pharmacogenetics. *Progress in medical genetics*, vol. III, p. 49—74. London 1964.
- RAYMOND, S., and L. W. WEINTRAUB: Acrylamid gel as a supporting medium for zone electrophoresis. *Science* **130**, 711 (1959).
- RUBINSTEIN, H. J.: Comparative quantitative analysis of normal and pathological sera by electrophoresis in starch-gel and cellulose-acetat. *Clin. chim. Acta* **7**, 65—72 (1962).
- SCHLEFFARTH, F., H. GÖTZ u. S. EBERT: Über Esterase-aktive Fraktionen in verschiedenen menschlichen Organextrakten. *Clin. chim. Acta* **14**, 519—522 (1966).
- SMITHIES, O.: Zone electrophoresis in starch gels: group variations in the serum proteins of normal human adults. *Biochem. J.* **61**, 629 (1955).
- An improved procedure for starch-gel electrophoresis: further variations in the serum proteins of normal individuals. *Biochem. J.* **71**, 585 (1959).

Prof. Dr. H. KLEIN
69 Heidelberg, Voß-Str. 2