

Dünnschicht-Stärkegel-Elektrophorese zur Bestimmung der Phosphoglucomutase-Typen an Blutspuren

IRMGARD OEPEN

Institut für Rechtsmedizin der Universität Marburg

Eingegangen am 21. Mai 1970

Thin-Layer Starch Gel Electrophoresis for Determination of Phosphoglucomutase Types in Blood Traces

Summary. The thin-layer starch gel method for PGM typing of very small bloodstains recommended by Wraxall and Culliford was found to be advantageous with some modifications. The phenotypes can be differentiated after storage of 8—10 weeks, and occasionally after 5 months. This is longer than if Brinkmann's method is used.

Key-Words: Blutspuren, Phosphoglucomutase — Spurenuntersuchung, Dünnschicht-Stärkegel-Elektrophorese.

Zusammenfassung. Die von Wraxall und Culliford empfohlene Methode zur Darstellung der PGM-Typen an einer dünnen Stärkeschicht, die eine Diagnose an sehr geringen Spuren-mengen ermöglicht, ließ sich mit einigen Modifikationen gut reproduzieren. Die Typen konnten so noch an etwas älteren Blutproben (bis zu 8—10, vereinzelt bis zu 20 Wochen) nachgewiesen werden, als es das von Brinkmann beschriebene Verfahren gestattet.

Wraxall und Culliford haben 1968 eine Abwandlung der von Spencer, Hopkinson und Harris entwickelten Methode beschrieben, mit deren Hilfe die Phosphoglucomutase(PGM-)-Typen noch an sehr geringen Spuren-mengen dargestellt werden können. Mit dieser Technik wurde die Nachweisbarkeit von Blutspuren bis zu einem Alter von 20 Wochen geprüft, aber das von Radam und Strauch angegebene Puffer-System verwendet, weil es während der Elektrophorese kaum Wärme entwickelt.

Material und Methode

Auf Woll- und Baumwollstoff wurde Blut der 3 häufigsten vom PGM₁-Locus gesteuerten Typen getropft und bei Zimmertemperatur gelagert. Blutspuren auf festen Spurenlägern wurden nicht untersucht, da bekannt ist, daß sie weniger Schwierigkeiten bereiten (Brinkmann). Zur Analyse wurden die Spuren (nach Culliford sowie Wraxall und Culliford) mit dem Spurenläger verimpft. Die etwa 1 × 6 mm großen Proben wurden direkt vor dem Einsetzen in das Gel mit gerade soviel Gelpuffer angefeuchtet, wie sie aufsaugen konnten. Kochsalzlösung und 0,04% Ammoniaklösung waren weniger geeignet. Baumwollstoff wurde in 2—3 Lagen verimpft, Wollstoff nur in einer Schicht. Für Frischblutkontrollen benötigt man nur einfache Filterpapierstreifen (Whatman 3 MM) der angegebenen Größe.

Für das Gel wurde Biotest-Stärke verwendet. Im Gegensatz zu Wraxall und Culliford wurden mit einem 1—2 mm dicken Gel bessere Ergebnisse erzielt als mit einer dünneren Schicht. Es erwies sich gegenüber dem Vorschlag von Wraxall und Culliford als einfacher, die Gußbank mit mehreren Glasplatten so anzulegen, daß bis zum oberen Außenrand 1,5 mm verbleiben. Das flüssige, heiße Gel wurde in den vorbereiteten Raum der Kammer gegossen, die überstehende Menge mit einem über den Oberrand der Außenkanten geführten Lineal entfernt. Nach einer knappen Stunde wurde das erkaltete Gel von den Rändern der Gußbank

gelöst, die zum Auffüllen verwendeten Glasplatten wurden mit der dünnen Gelschicht herausgenommen, und nur die oberste Glasplatte mit der dünnen Gelschicht wurde auf den Boden der Gußbank gelegt. Auf der Anoden- und der Kathodenseite wurden Fließpapierbrücken durch die Öffnungen der Gußbank gezogen (3 Lagen Papier Nr. 2043 bmgI der Firma Schleicher & Schüll), von denen je ein Blatt in der Breite von etwa 1 cm die angrenzende Gelschicht bedecken muß, um den Kontakt zum Elektrodenpuffer herzustellen.

Der Elektrodenpuffer läßt sich nach den Angaben von Radam und Strauch mehrfach verwenden, wenn man die gebrauchten Lösungen in ein Gefäß zusammenschüttet und die verdunstete Wassermenge ergänzt. Für die Verbindung zwischen den Kathoden- und Anodenanteilen in der Pufferwanne hat sich eine Lage einfacher Vlieseline bewährt (s. Hennig, Hoppe und Kaifie), die fast unbegrenzt verwendbar ist.

Die Gel-Abmessungen und Elektrophorese-Bedingungen sind in den Bildunterschriften angegeben. Sie wurden der Methode nach Radam und Strauch entnommen, die außerdem in einer persönlichen Mitteilung darauf hingewiesen haben, daß bereits nach einer Trenndauer von 6 Std eine gute Darstellung der PGM-Typen möglich ist, wenn Spannung und Stromstärke erhöht werden.

Die Startlinie wurde nach Wrxall und Culliford zwischen das erste und zweite Drittel der Entfernung zwischen Kathode und Anode gelegt. Die Laufstrecke bis zur f-Zone beträgt dann etwa 5—6 cm. Das horizontale Aufschneiden des Gels erübrigte sich bei Verwendung der dünnen Schicht. Die Anfärbung der unteren Fläche gab bessere Ergebnisse als die Behandlung der oberen.

Die Reaktions-Lösung wurde — im Gegensatz zu Culliford sowie Radam und Strauch — nicht mit Agar angedickt, sondern flüssig zugegeben. Dadurch konnte der Färbevorgang beliebig unterbrochen werden. Nach dem Wässern des gefärbten Gels waren die Typen dann mindestens noch 1 Tag nach Aufbewahrung im Kühlschrank ablesbar. In gefrorenem Zustand blieben die Farben noch länger erhalten (s. Herbieh und Kahlich). Allerdings wurde das Gel dann fleckig und eignete sich nicht mehr zum Fotografieren.

Ergebnisse und Diskussion

Die auf Baumwollstoff getrockneten Blutspuren ließen sich länger nachweisen (8—10 Wochen, vereinzelt bis 20 Wochen) als die entsprechenden Wollproben (6—8 Wochen, vereinzelt bis 12 Wochen). Das ist etwas länger, als es die Methode nach Brinkmann gestattet (7 Wochen auf saugfähigen Spurentägern). Für ältere Spuren wurde etwas mehr Substanz benötigt als für frischere Proben.

Baumwollproben zeigten keine irreführenden Transformationen. Lediglich die Zonen c bis f blaßten ab (Probe 8, Abb. 1; Probe 9, Abb. 2; Probe 6, Abb. 3) oder waren durch einen schmierenden Farbstreifen miteinander verbunden. Dieser Farbstreifen trat sowohl als Folge von Überdosierung als auch von Alterung auf und konnte sich gelegentlich auch kathodenwärts über die PGM-Zonen hinaus ausdehnen (Probe 3, Abb. 3). Er machte sich bei den Wollproben häufiger und früher (bereits nach 6 Wochen) störend bemerkbar. Bei den Wollproben kam auch häufiger eine Verlagerung der Zonen vor (Annäherung von a- und c-Punkten bei 1-1-Typen und b- und d-Punkten bei 2-2-Typen, s. Proben 8 und 9, Abb. 1). Bei einem Spurenalter von 8 Wochen waren — ebenfalls bei Wollproben wesentlich häufiger als bei Baumwollproben — 1 oder 2 zusätzliche, anfangs blau, mit zunehmendem Alter der Proben bräunlich gefärbte Zonen kathodenwärts vom a-Punkt (Probe 5, Abb. 3) zu beobachten. Wegen seiner Lage außerhalb der PGM-Zonen und wegen der bei längerer Lagerung auftretenden anderen Anfärbung führt dieses Phänomen aber kaum zu einer Fehldiagnose. Auch die beschriebene Verlagerung der Zonen führt dann nicht zu einem falschen Ergebnis, wenn eine Blutprobe häufig genug verimpft wurde, da die Transformationen nicht immer

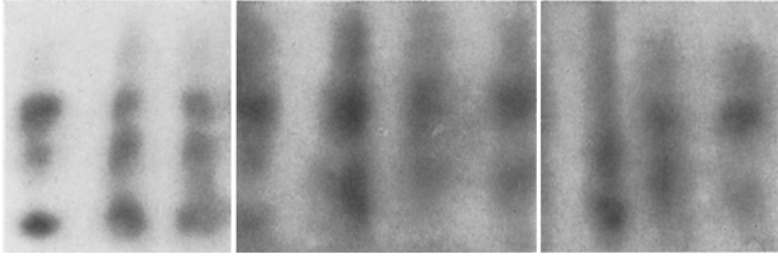


Abb. 1. PGM-Darstellung an etwa 1,5 mm dickem Stärkegel (Fläche 16×15 cm). Am Gel gemessen 5—6 V/cm, 2 mA/cm² zu Beginn der Laufzeit, Trenndauer 15 Std bei 4—5° C. Startlinie am unteren Bildrand. Typ, Spureträger und Spurealter von links nach rechts: (1) 1—1 Frischblutkontrolle; (2) 1—1 Wolle, 3 Tage; (3) 1—1 Baumwolle, 3 Tage; (4) 1—1 Frischblutkontrolle; (5) 2—2 Wolle, 4 Wochen; (6) 2—2 Baumwolle, 4 Wochen; (7) 2—2 Frischblutkontrolle; (8) 1—1 Baumwolle, 15 Wochen; (9) 2—2 Wolle, 9 Wochen; (10) 2—2 Frischblutkontrolle

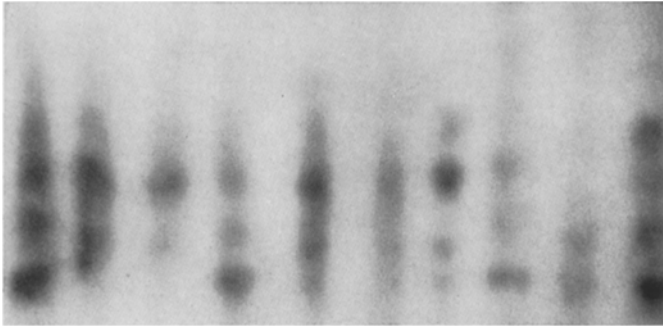


Abb. 2. PGM-Darstellung (Gel-Abmessungen, Elektrophorese-Bedingungen und Startlinie wie bei Abb. 1 angegeben). Typ, Spureträger und Spurealter von links nach rechts: (1) 1—1 Wolle, 10 Wochen; (2) 2—2 Wolle, 7 Wochen; (3) 2—2 Baumwolle, 7 Wochen; (4) 1—1 Mantelfutter (Gerichtsfall), 4 Wochen; (5) 2—1 Wolle, 7 Wochen; (6) 2—1 Baumwolle, 7 Wochen; (7) 2—1 Frischblutkontrolle; (8) 1—1 Wolle, 10 Wochen; (9) 1—1 Baumwolle, 10 Wochen; (10) 1—1 Frischblutkontrolle

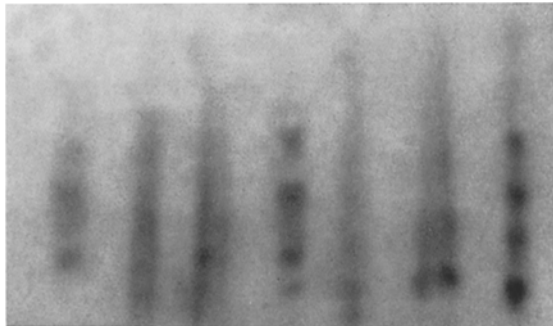


Abb. 3. PGM-Darstellung (Gel-Abmessungen und Startlinie wie bei Abb. 1 und 2 angegeben). Am Gel gemessen 11—12 V/cm, 6 mA/cm² zu Beginn der Laufzeit, Trenndauer 6 Std bei 4—5° C. Typ, Spureträger und Spurealter von links nach rechts: (1) 2—2 Frischblutkontrolle; (2) 2—1 Wolle, 13 Wochen; (3) 2—1 Baumwolle, 13 Wochen; (4) 2—1 Frischblutkontrolle; (5) 1—1 Wolle, 20 Wochen; (6) 1—1 Baumwolle, 20 Wochen; (7) 1—1 Frischblutkontrolle

gleich stark auftreten. Mehrfaches Verimpfen ist sowieso unerlässlich, da die Dosis der Blutspur — vor allem bei unbekanntem Spurenalter — meistens nicht sofort richtig gewählt werden kann. Auf diese Schwäche der Methode wies bereits Culliford eindringlich hin (der im übrigen keine Transformationen erwähnt). So kam es fast in jedem Lauf zu unterschiedlich angefärbten und ablesbaren Auftrennungen.

Aus diesem Grunde wurde die flüssige Entwicklerlösung vorgezogen, die es ermöglicht, den Färbevorgang dann abzubrechen, wenn die entscheidenden Proben optimal dargestellt sind. Außerdem kann zu verschiedenen Zeiten abgelesen und gegebenenfalls fotografiert werden.

Den Kollegen Dr. G. Radam und Dr. H. Strauch danken wir für die Einarbeitung in ihre Methode der PGM-Darstellung und für spätere schriftliche Hinweise.

Literatur

- Brinkmann, B.: Bestimmung der Phosphoglucomutase-Typen aus Blutspuren. *Dtsch. Z. ges. gerichtl. Med.* **66**, 31—34 (1969).
- Culliford, B.: The determination of phosphoglucomutase (PGM) types in bloodstains. *J. forens. Sci. Soc.* **7**, 131—133 (1967).
- Hennig, W., Hoppe, H., Kaifie, S.: Die elektrophoretische Bestimmung der sauren Erythrozytenphosphatasegruppen mit Polyacrylamid-Gel. *Ärztl. Lab.* **14**, 273—278 (1968).
- Herbich, J., Kahlich, D.: Verteilung der sauren Erythrozyten-Phosphatase in der Bevölkerung von Wien und Umgebung. *Wien. klin. Wschr.* **80**, 452—460 (1968).
- Radam, G., Strauch, H.: Die Darstellung der Phosphoglucomutase-Varianten. *Ärztl. Lab.* **15**, 7—12 (1969).
- Wraxall, B., Culliford, B.: A thin-layer starch gel method for enzyme typing of bloodstains. *J. forens. Sci. Soc.* **8**, 81—82 (1968).

Dr. med. I. Oepen
D-3550 Marburg
E. Mannkopff-Straße 2