

Aktivitätsbestimmungen der sauren Phosphatase in verschiedenen biologischen Medien unter Verwendung von o-Carboxyphenylphosphat

GOTTFRIED WALTHER und PETER HÖHN

Institut für Rechtsmedizin und Pathologisches Institut
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz (BRD)

Eingegangen am 7. Mai 1971

Quantitative Estimation of Acid Phosphatase in some Biological Fluids

Summary. On investigation of human seminal traces the evidence of high activity of acid phosphatase implies important information. Some substrates are known for measurement of this enzyme activity. With the aid of o-Carboxyphenylphosphate in 0.1 M sodium acetate/ acetic acid buffer the conditions for quantitative measurement of human seminal acid phosphatase were found to be optimal at pH 4.6–5.8 and pS 2.3–2.7 (Walther). As the acid phosphatase is present in many biological fluids, it is necessary to know the rate of hydrolysis by these enzymes. Therefore in this paper the activity of acid phosphatase in the following biological fluids was measured: Human and bull ejaculates, vaginal smears, urines, anal swabs, secretes of snails, plant juices (cauli flower and painter's flower) and some bacteria.

In the human ejaculates were noticed activities about 10^4 – 10^6 U, in bovine ejaculate about 10^3 – 10^4 and in fluid of cauli flower 10^3 – 10^4 U. In the other investigated fluids substrate splitting was very low or negative (see table). It is impossible to detect a very small trace of acid phosphatase because the substrate is splitting spontaneously. But this is not important because anyway activities from 10^4 – 10^6 U have diagnostical information.

Zusammenfassung. Unter den für die Bestimmung der menschlichen sauren Spermaphosphatase festgestellten Bedingungen wurden die Spaltungsraten verschiedener Substanzen menschlicher, tierischer und pflanzlicher Herkunft bestimmt. Im Humansperma wurden etwa 10^4 – 10^6 U, im bovinen etwa 10^3 – 10^4 und im Blumenkohlpreßsaft 10^3 – 10^4 U festgestellt. In den übrigen Substanzen ist zwar eine geringe Hydrolyserate, die auch durch saure Phosphataseaktivität bedingt sein kann, nicht auszuschließen, jedoch ist dieses Ferment nicht mit Sicherheit nachweisbar. Die Untersuchungsergebnisse zeigen, daß die saure Phosphatase des menschlichen Ejaculates o-Carboxyphenylphosphat sehr schnell hydrolysiert, aber auch im Blumenkohlpreßsaft ist eine relativ hohe Aktivität vorhanden.

Key words: Saure Phosphatase, Aktivitätsbestimmungen — Spermaphosphatase — Spermanachweis.

In dieser Zeitschrift (66, 1/1969) wurde zur quantitativen Messung der sauren Phosphatase im Rahmen der gerichtsmedizinischen Spermaspurenuntersuchung als Substrat o-Carboxyphenylphosphat empfohlen und die optimalen Meßbedingungen festgestellt. Dieses Substrat wird von der sauren Spermaphosphatase relativ schnell hydrolysiert. Im vorliegenden Beitrag sollen die bisherigen Erfahrungen mit diesem Substrat dargelegt und die Hydrolyseraten anderer saurer Phosphatasen tierischer und pflanzlicher Herkunft untersucht werden. Dieses Kenntnis ist für die Interpretation von Enzymbestimmungen im Rahmen der Spermaspurenuntersuchung von Bedeutung, da die saure Phosphatase praktisch ubiquitär vorkommt (Literaturübersicht bei Leithoff und Höhn).

Material und Methode

Es wurden menschliche und bovine Ejaculate, einige humane Körperflüssigkeiten, Bakterienkulturen, Pflanzenpreßsäfte und einige Schneckenschleime untersucht. Ejaculat, Speichel, Vaginalsekret und Urin wurden nativ verwandt. Bei den übrigen humanen Spuren handelt es sich um Tupperabstriche oder Textilgewebe, die jeweils in 2—5 ml physiologischer Kochsalzlösung eluiert und danach zentrifugiert wurden. Im Überstand erfolgte die Bestimmung der sauren Phosphatase. Die Körperflüssigkeiten und Spureneluate wurden mikroskopisch auf das Vorhandensein von Samenzellen untersucht. Der Samenzellenbefund im Ausstrich oder Bodensatz der Eluate ist in der Tabelle angegeben. Die Pflanzensäfte wurden durch Zerstampfen im Mörser und die Schneckenschleime durch Kricchenlassen über Filterpapier und Elution in 3 ml physiologischer Kochsalzlösung gewonnen. Die Züchtung der Bakterienkulturen erfolgte in 15 ml Boullion und hierin wurde auch die Keimzahl festgestellt, die in der Tabelle in Klammern angegeben ist. Die Boullion wurde dreimal mit physiologischer Kochsalzlösung gewaschen, zentrifugiert und die Bakterien mit 2 ml Aqua bidest und 1 min Einwirkung von Ultraschall homogenisiert.

Die Messungen erfolgten bei 25°C in 0,1 M Essigsäure/Natriumacetatpuffer bei pH 5,2 und pS 2,6 (Walther). Es wurde jeweils eine Doppelbestimmung durchgeführt und in den Ergebnissen der Mittelwert angegeben. Die Substanzen mit hohen Enzymgehalten wurden nach Bedarf 1:10 oder 1:100 verdünnt.

Ergebnisse

Die Ergebnisse der Enzymmessungen und mikroskopischen Untersuchungen sind im einzelnen aus der Tabelle 1 zu entnehmen. Die Reaktion wurde in 3 ml Testansatz mit 0,1 ml Probe in Gang gesetzt. In der Tabelle ist in der Spalte 3 die reine Hydrolyserate und in der Spalte 4 die Umrechnung in internationale Enzymeinheiten angegeben. Da der Spontanzerfall des Substrates unter den angegebenen Meßbedingungen bis 2,0 $\mu\text{M}/\text{min}$ oder auch etwas darüber betrug, erfolgte die Umrechnung in Enzymaktivitäten erst ab einer Hydrolyserate von 3,0 $\mu\text{M}/\text{min}$.

Diskussion

Die optimalen Bedingungen für die Bestimmung der menschlichen sauren Spermaphosphatase wurden in 0,1 M Acetat/Essigsäurepuffer bei pH 4,6—5,8 und pS 2,3—2,7 festgestellt (Walther). Wie bisher nicht veröffentlichte Untersuchungen zeigten, stimmen diese Optima für die saure Phosphatase aus Blumenkohl und Bullensperma nicht überein. Auch für die anderen Substanzen ist ein unterschiedliches biochemisches Verhalten anzunehmen. Da die Aktivitätsbestimmung der sauren Phosphatase im Rahmen einer Spurenuntersuchung in dem für die menschliche saure Spermaphosphatase optimalen Bereich erfolgen muß, wurden bei den Messungen diese Bedingungen gewählt.

Die Ergebnisse zeigen, daß o-Carboxyphenylphosphat von der sauren Phosphatase der hier untersuchten biologischen Substanzen sehr langsam oder nicht gespalten wird. Lediglich der Blumenkohlpreßsaft und auch das bovine Ejaculat zeigten eine sehr hohe Aktivität, die der des unverdünnten menschlichen Ejaculates nahekommt. Von besonderer Bedeutung sind die mit o-Carboxyphenylphosphat gefundenen negativen Werte. Im Preßsaft von Malerblumen sind mit Phenylphosphat wesentlich höhere Werte zu messen (Leithoff). Diese Untersuchungsergebnisse weisen wiederum darauf hin, daß die Höhe einer gemessenen Fermentaktivität vom angewandten Substrat abhängig ist.

Tabelle 1. *Ergebnisse der Enzymmessung im einzelnen*

Bei den Bakterienkulturen ist die Keimzahl pro ml Bouillon eingetragen. Von den untersuchten biologischen Substanzen zeigt nur der Blumenkohlpreßsaft eine Aktivität an saurer Phosphatase, die der in Ejaculaten nahe kommt.

Untersuchtes Material	Anzahl Proben	Samenzellenbefund	Hydrolyse-rate ($\mu\text{M}/\text{min}$)	Aktivität (U)
Ejaculate:				
a) human	20	positiv	10^3 — 10^5	$3 \cdot 10^4$ — $3 \cdot 10^6$
b) bovin	3	positiv	15 — $3,2 \cdot 10^2$	$4,6 \cdot 10^2$ — $9,9 \cdot 10^3$
Vaginalsekrete	15	negativ	2—5	bis $1,5 \cdot 10^2$
Speichel	5 ♀, 5 ♂	negativ	2—4	bis $1,2 \cdot 10^2$
Urin:				
a) weiblich	10	negativ	2—3,5	bis 10^2
b) männlich				
10—30 min nach Ejaculation	5	positiv	50— 10^3	$1,5 \cdot 10^3$ — $3 \cdot 10^4$
5—8 Std nach Ejaculation	5	negativ/ positiv	6—25	$1,8 \cdot 10^3$ — $8 \cdot 10^3$
8 und mehr Tage nach Ejaculation	5	negativ/ positiv	30—80	$9 \cdot 10^2$ — $2,5 \cdot 10^3$
Euate von Textilspurenträgern	6 32	positiv negativ/ fragl. positiv	$1,8$ — $1,6 \cdot 10^3$ $1,8$ —8,0	$0,5 \cdot 10^2$ — $5,5 \cdot 10^4$ $0,5 \cdot 10^2$ — $2,4 \cdot 10^2$
Afterabstriche	5	negativ	2,5—3,5	bis 10^3
Schneckenschleime:				
a) Weinbergschnecke	1	—	2,7	—
b) Schnürkelschnecke	1	—	1,9	—
Pflanzensäfte:				
a) Blumenkohl	5	—	30—650	10^3 — $2 \cdot 10^4$
b) Malerblume (20 Blüten zerstampft)		—	1,8—3,2	—
Bakterienkulturen:				
a) <i>E. coli</i> (10^{12})	1	—	3,5	108
b) <i>Proteus</i> ($3 \cdot 10^{12}$)	1	—	2,7	—
c) <i>Pyocyanus</i> ($5 \cdot 10^{12}$)	1	—	3,1	—
d) <i>Enterococcus</i> (10^{13})	1	—	2,1	—
e) <i>Staphylococcus albus</i> ($8 \cdot 10^9$)	1	—	1,8	—
f) <i>Staphylococcus aureus</i> ($5 \cdot 10^{10}$)	1	—	1,8	—

Das hier angewandte Substrat ist nicht stabil. Bei den Bestimmungen wurde eine spontane Hydrolyserate bis $2 \mu\text{M}/\text{min}$ oder gering darüber festgestellt. Die Umrechnung in internationale Enzymeinheiten ergibt sich bei Messung in 1 cm Cuvetten wie folgt:

$$U = \frac{\mu\text{M}/\text{min} \cdot V \cdot F}{v}$$

Es bedeuten:

V = Gesamtvolumen, v = Probelösung, F = Verdünnungsgrad.

Für einen Spontanzerfall von $2 \mu\text{M}/\text{min}$ ergibt sich bei der Berechnung eine scheinbare Aktivität von 62 U. Aus Sicherheitsgründen wurde in der Tabelle der Ergebnisse erst ab einer Hydrolyserate von $3 \mu\text{M}/\text{min}$ auf Enzymeinheiten umgerechnet. Diese Methode ist somit für den Nachweis kleinster Mengen saurer Phosphatase nicht geeignet. Für eine Spermaspurenuntersuchung ist dieser Umstand jedoch von untergeordneter Bedeutung, da ohnehin nur Aktivitäten von 10^4 – 10^6 U eine diagnostische Information beinhalten.

Die Untersuchungsergebnisse haben somit gezeigt, daß bei der Bestimmung der sauren Phosphatase unter Verwendung von *o*-Carboxyphenylphosphat eine größere Anzahl phosphatasehaltiger biologischer Substanzen praktisch nicht erfaßt wird. Die sehr hohe Aktivität im Blumenkohlpreßsaft weist auch bei diesem Substrat darauf hin, daß quantitative Messungen der sauren Phosphatase immer noch kritisch zu beurteilen sind.

Literatur

1. Höhn, P.: Untersuchungen zur elektrophoretischen Trennung und Identifizierung verschiedener saurer Phosphatasen. Diss. Med. Fak. Mainz 1970.
2. Leithoff, H.: Der gerichtsmedizinische Spermanachweis. Habil. Med. Fak. Freiburg 1962.
3. Walther, G.: Über die Verwendung von *o*-Carboxyphenylphosphat zum Nachweis saurer Phosphatase im Sperma. Dtsch. Z. ges. gerichtl. Med. **66**, 1 (1969).

Dr. med. G. Walther
Institut für Rechtsmedizin
D-6500 Mainz
Langenbeckstr. 1

Dr. med. P. Höhn
Pathologisches Institut
D-6500 Mainz
Langenbeckstr. 1