

Originalarbeiten — Original Papers

Haptoglobintypenbestimmung mittels vertikaler Säulenelektrophorese in Polyacrylamidgel

REINHARD HILGERMANN

Institut für Rechtsmedizin der Universität Marburg (BRD)

Eingegangen am 4. Oktober 1971

Haptoglobin Typing by Electrophoresis in Vertical Polyacrylamide Gel Columns

Summary. A continuous and two discontinuous polyacrylamide gel electrophoresis techniques for haptoglobin typing are described. Their advantages are compared with the results achieved by starch gel electrophoresis. All three techniques are equally suited for routine purposes. While the continuous PAA gel electrophoresis offers some technical simplifications, it is inferior to the disc methods with regard to separation results of the haptoglobin band spectrum.

Zusammenfassung. Ein kontinuierliches und zwei diskontinuierliche Polyacrylamidgel-elektrophoreseverfahren zur Haptoglobintypendifferenzierung werden beschrieben und die Vorzüge dieser Technik den mit der Stärkegelelektrophorese zu gewinnenden Ergebnissen gegenübergestellt. Alle 3 Verfahren sind für die Routinediagnostik geeignet. Die kontinuierliche PAA-Gelelektrophorese bedeutet zwar eine geringe Vereinfachung der Methodik, sie ist aber den Disk-Verfahren hinsichtlich der Trennungsergebnisse des Hp-Bandenspektrums unterlegen.

Key words: Haptoglobintypenbestimmung, Polyacrylamidgel-Disk-Elektrophorese — Säulenelektrophorese, Hp-Bestimmung in Polyacrylamidgel.

Die von Raymond u. Weintraub [25] eingeführte kontinuierliche Polyacrylamid-(PAA)-Gel-Elektrophorese und ihre Weiterentwicklung zur Disk-Elektrophorese durch Ornstein [21] und Davis [8] ist als eine Bereicherung elektrophoretischer Trennverfahren anzusehen. Sie gilt als eine der zur Zeit besten Trennmethode für Proteine [31]. Die Vorteile des PAA-Gels sind u. a.: chemische Stabilität und Indifferenz, Stabilität gegenüber pH- und Temperatur-Änderungen, Steuerbarkeit der gewünschten Porenweite, glasklare Transparenz und fast völliges Fehlen störender Adsorptions- und Elektroosmose-Erscheinungen (vgl. auch Maurer [19]).

Strittig ist noch die Frage, ob man grundsätzlich der diskontinuierlichen PAA-Elektrophorese den Vorzug geben soll. Diese unterscheidet sich bekanntlich von der kontinuierlichen PAA-Elektrophorese durch pH- und Porengrößen-Diskontinuitäten innerhalb der Gelsäule [19]. Dadurch soll eine erhöhte Konzentrierung der Substanzlösung (z. B. Serum) und eine schärfere Darstellung der Banden erreicht werden. Nach Auffassung einiger Autoren sollen sich jedoch mit einem kontinuierlichen Puffersystem ähnlich gute Trenneffekte erzielen lassen [1, 2, 14, 18, 26], zumal man durch Verdünnung oder Dialyse der aufzutrennenden Substanz eine genügend scharfe Startzone herstellen kann [14, 18].

Es war naheliegend, daß das PAA-Gel als Trägersubstanz mit seinem hohen Auflösungsvermögen auch der Haptoglobintypenbestimmung nutzbar gemacht

wurde. Inzwischen sind einige Verfahren zur Hp-Diagnostik beschrieben worden, und zwar als Mikromethode (horizontale Dünnschichtelektrophorese [3, 20]) oder im Gelblock [7, 13, 15] sowie als vertikale Elektrophorese in Gelplatten [2, 10, 26, 36] oder in Gelsäulen [5, 6, 8, 9, 12, 16, 22, 28, 29, 30]. Die PAA-Gel-Elektrophorese hat sich aber anscheinend in der Routinediagnostik der Blutgruppenlaboratorien noch nicht genügend durchgesetzt. Es soll daher hier die als optimal erarbeitete Technik der Disk-Elektrophoreseverfahren zur Hp-Diagnostik mitgeteilt werden, ferner wird kurz über die Ergebnisse der Erprobung eines in der Proteindifferenzierung verwendeten kontinuierlichen PAA-Elektrophoreseverfahrens [1] zur Hp-Darstellung berichtet.

Material und Methoden

Apparatur

Als Elektrophoresegerät dient unser von Schaible [29] entwickeltes, aus Trovidur hergestelltes Kathodengefäß von 12 cm Durchmesser, das einem etwa 15 cm hohen Standgefäß aus Glas (Anodengefäß) eingepaßt ist. Das Kathodengefäß enthält in einer dem Schema (Abb. 1) zu entnehmenden Anordnung 16 mit Gummistopfen fixierte Glasröhrchen aus kalibriertem Präzisionsglas von 14 cm Länge und 0,5 cm Durchmesser. Eine ausführliche Beschreibung erübrigt sich, da mittlerweile über den Handel zahlreiche ähnliche Modelle verfügbar sind, z. B.: Acrylamid-Säulenelektrophoresegerät¹, Acrylophor², Standard-PAA³, Disc-Elektrophorese-Automat⁴.

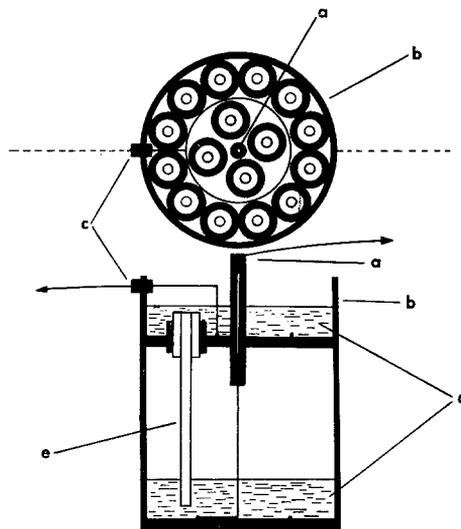


Abb. 1. Schematische Darstellung der Elektrophoreseapparatur. *a* Anode; *b* Kathodengefäß; *c* Kathode; *d* Puffer; *e* ein Gelröhrchen (aus Schleyer u. Schaible)

- 1 Shandon Labortechnik, 6 Frankfurt a. Main 50, Postfach 29.
- 2 N. V. Pleuger S. A., Wijnegem, Belgien.
- 3 E. Barth, 6804 Ilvesheim, Postfach 56.
- 4 Dr. K. Slevogt, Wissenschaftl.-Techn. Werkstätten, 812 Weilheim.

Reagentien

Acrylamid (AA), Merck; N,N'-Methylenbisacrylamid (BIS), Merck; Dimethylaminopropionitril (DMAPN), Serva; N,N,N',N'-Tetramethyläthylendiamin (TEMED), Serva; Ammoniumperoxodisulfat (APOS), Merck; Riboflavin, Merck; Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (TRIS), Merck; Glykokoll, Merck; Borsäure krist. (H_3BO_3); Natronlauge (NaOH); Kaliumferricyanid; Bromphenolblau.

*I. Diskontinuierliche PAA-Gel-Elektrophorese, modifiziert nach Davis [8] und Ornstein [21]**1. Beschicken der Elektrophorese-Röhrchen*

Zunächst pipettiert man die aus Tabelle 2 ersichtlichen, für einen Ansatz von etwa 16 Röhrchen bemessenen Komponenten des Trenngels in ein Becherglas und mischt gut durch. Die an ihrer unteren Öffnung mit einem Gummistopfen versehenen Röhrchen füllt man in vertikaler Stellung luftblasenfrei 10,5 cm hoch mit dem Trenngel-Monomer-Gemisch (etwa 2,2 ml), überschichtet vorsichtig mit Wasser und läßt je nach Zimmertemperatur 45—75 min polymerisieren. Nach Verfestigung des Gels wird die überstehende Lösung verworfen, 0,2 ml des frisch zubereiteten Sammelgels (Tabelle 2) werden eingefüllt, ebenso mit Wasser überschichtet und 30 min unter einer Tageslichtfluoreszenzlampe photokatalysiert. Anschließend wird die flüssige

Tabelle 1. *Stammlösungen*^a

A. Trenngel-Puffer, pH 8,9		B. Sammel- und Probengel-Puffer, pH 6,7	
1 N HCl	48,0 ml	1 N HCl	52,0 ml
TRIS	36,3 g	TRIS	5,98 g
TEMED	0,23 ml	TEMED	0,46 ml
Aqua bidest. ad	100,0 ml	Aqua bidest. ad	100,0 ml
C. Trenngel-Monomer-Gemisch		D. Sammel- und Probengel-Monomer-Gemisch	
AA	30,0 g	AA	10,0 g
BIS	0,8 g	BIS	2,5 g
Aqua bidest. ad	100,0 ml	Aqua bidest. ad	100,0 ml
E. Katalysator		F. Photokatalysator	
APOS	0,14 g	Riboflavin	0,008 g
Aqua bidest. ad	100,0 ml	Aqua bidest. ad	100,0 ml

^a Die Lösungen A—D und F werden in braunen Flaschen aufbewahrt. Die Lösungen A—D sind bei Zimmertemperatur mehrere Monate, Lösung E bei +4°C etwa 14 Tage, Lösung F höchstens 3 Wochen haltbar.

Tabelle 2. *Gebrauchslösungen*

	Ansatz für 16 Röhrchen	Gelkonzentration
Trenngel-Lösungen		
1 Teil Lösung A	4,0 ml	6,15%
2 Teile Lösung C	8,0 ml	
4 Teile Lösung E	16,0 ml	
3 Teile Aqua bidest.	12,0 ml	
Sammel- und Substanzgel-Lösungen		
1 Teil Lösung B	1,0 ml	3,15%
2 Teile Lösung D	2,0 ml	
1 Teil Lösung F	1,0 ml	
4 Teile Aqua bidest.	4,0 ml	

Schicht wiederum verworfen und das Gel unmittelbar mit einem Tropfen (etwa 0,05 ml) eines Serum-Hb.-Gemisches (4 Teile Serum, 1 Teil Hämoglobinlösung) beimpft. Dabei ist darauf zu achten, daß die Pipette die Geloberfläche nicht berührt. Sodann wird das Serum-Hb.-Gemisch mit 0,2 ml wiederum frisch bereiteten Sammelgels überschichtet. Die anschließende erneute Photopolymerisation ist nach 20—30 min abgeschlossen; ein erneutes Überschichten mit Wasser vor der Photokatalyse erübrigt sich. Die Hämoglobinstammlösung wird in der üblichen Weise hergestellt [24].

2. Puffersystem

Der Elektrodenpuffer an Kathode und Anode ist ein Tris-Glycine-Puffer, pH 8,5: TRIS 30,0 g, Glykokoll 144,0 g, Aqua bidest. ad 1000,0 ml. Diese Stammlösung wird jeweils vor Gebrauch 1:10 verdünnt.

3. Elektrophorese

Die Röhren werden nach unten hängend in den Boden des oberen Puffergefäßes so eingesetzt, daß ihre obere Öffnung mit dem Gummistopfen abschließt. In das Kathodengefäß werden 150 ml, in das Anodengefäß 400 ml Elektrodenpuffer gefüllt. Es ist darauf zu achten, daß die Gelsäulen an den Röhrenenden Kontakt mit dem Puffer haben, die Röhren also luftblasenfrei sind. Man kann, obwohl das freie Hämoglobin als Indicator für die Laufstrecke gilt, das Albumin durch Zugabe von 0,05 ml einer Bromphenolblaulösung (Bromphenolblau 0,04 g, Aqua bidest. ad 100,0 ml) zum Kathodenpuffer markieren. Die Elektrophorese ist zu beenden, wenn das gut sichtbare freie Hb. das anodische Ende der Röhren erreicht hat. Die Trennzeit beträgt bei einem Stromdurchgang von 3 mA je Röhren und einer Ausgangsspannung von etwa 120 V 4,5 Std. Es empfiehlt sich, ein Gleichstromnetzgerät zu verwenden, bei dem sich die Stromstärke stabilisieren läßt. Bei einer Stromstärke von 48 mA bleibt die nicht zu vermeidende leichte Erwärmung des Gels unter der Proteindenaturierungsgrenze, und eine Kühlung ist nicht erforderlich. Erfahrungsgemäß stellen sich die Banden schärfer und gerader dar, wenn man die Stromstärke zunächst für etwa 30 min auf die Hälfte der angegebenen mA-Zahl herabsetzt. Nach der Elektrophorese werden die Röhren herausgenommen und in Eiswasser gelegt. Die Gele lassen sich sodann sehr leicht mit Hilfe einer auf eine 10 ml-Plastikspritze aufgesetzten hypodermatischen Kanüle von 10 cm Länge aus dem Röhren herauslösen. Die stumpfe Nadel (Nr. 20) wird unter gleichzeitigem Injizieren von Wasser zwischen Glaswand und Geloberfläche eingeführt. Während man weiterhin Wasser injiziert, wird das Röhren ständig vorsichtig gedreht. Dabei löst sich das Gel und fällt schließlich aus dem Röhren heraus.

4. Färbung und Auswertung

Zur elektiven Darstellung der Hp-Fraktionen wurde eine Fülle von Peroxidase-Reagentien erprobt. Als Methode der Wahl, vor allem für die Routine, hat sich dennoch die übliche Benzidintechnik erwiesen. Das Reaktionsgemisch hat die Zusammensetzung: Benzidin 1,0 g, Eisessig 50,0 ml, Aqua dest. 50,0 ml, Perhydrol 30% 1,0 ml. Das Benzidin wird erst in der Hälfte der Eisessigmenge in der Wärme gelöst. Das Reaktionsgemisch reicht für 16 Gelsäulen aus, die in einer eigens für den Färbegang konstruierten Färbeschale [29] mit transparentem Boden (Abbildung bei Schleyer und Schaible) angefärbt werden. 2—3 min nach Eingießen der Reaktionslösung stellen sich intensiv blaue Hp-Banden dar, deren Haltbarkeit, ähnlich wie beim Stärkegel, beschränkt ist. Nach Abgießen der Benzidinlösung wird unter fließendem Wasser abgespült und auf einem Lichtkasten ausgewertet. Eine begrenzte Konservierung gelingt auch hier mit Naphtholgelb-S; empfehlenswerter zur Haltbarmachung der Hp-Banden ist eine für das PAA-Gel modifizierte „Gegenfärbung“ mit Amidoschwarz [33]: Äthanol 70% 50,0 ml, Aqua dest. 50,0 ml, Eisessig 10,0 ml, Amidoschwarz 0,007 g. Die Gelsäulen werden 15—20 min in dieser Lösung nachgefärbt und anschließend in einer Waschflüssigkeit gleicher Zusammensetzung, jedoch ohne Farbkomponente, entfärbt. Man erhält recht kräftige, mehrere Stunden haltbare, elektiv angefärbte Haptoglobinbanden.

II. Diskontinuierliche PAA-Gel-Elektrophorese nach Schleyer u. Schaible [30]

1. Puffersystem

Der gebrauchsfertige Elektrodenpuffer ist ein 0,3 M Boratpuffer (pH 8,4): H_3BO_3 18,0 g, NaOH 2,4 g (60,0 ml 1 N NaOH), Aqua bidest. ad 1000,0 ml. Der Gelpuffer ist ein 0,03 M

Boratpuffer (pH 8,9): H_3BO_3 1,86 g, NaOH 0,48 g (12,0 ml 1 N NaOH), Aqua bidest. ad 1000,0 ml.

2. Gelzubereitung und Elektrophorese

Trenngel		Substanz- oder Verschußgel	
AA	5,5 g	AA	5,5 g
BIS	0,27 g	BIS	0,27 g
DMAPN	0,1 g	DMAPN	0,4 g
APOS	0,1 g	APOS	0,4 g
Gelpuffer ad	100,0 ml	Gelpuffer ad	100,0 ml

Um die Gelherstellung zu vereinfachen, setzt man die einzelnen Komponenten in größeren, einander äquivalenten Mengen an. Das etwa 5,5%ige Trenngel polymerisiert in 20–30 min, das Verschußgel in 3–5 min. Eine Photokatalyse entfällt, auf ein Sammelgel wird hier verzichtet. Die Stromstärke beträgt 3 mA je Röhrenchen, die Laufzeit 3,5 Std. Die Ansätze werden weiterbehandelt wie unter I, 3–4 beschrieben.

III. Kontinuierliche PAA-Gel-Elektrophorese, modifiziert nach Abraham u. Mitarb. [1]

1. Puffersystem

5,5 g TRIS und 14,4 g Glykokoll werden in 100,0 ml Aqua bidest. gelöst und vor Gebrauch als Elektrodenpuffer 1:10, als Gelpuffer 1:2,5 verdünnt (pH 8,6).

2. Trenngel-Stammlösungen

A. AA	23,1 g	B. DMAPN	0,8 g
BIS	0,8 g	Pufferstammlösung	40,0 ml
Aqua bidest. ad	100,0 ml	Aqua bidest. ad	100,0 ml
C. Kaliumferricyanid	0,03 g	D. APOS	0,48 g
Aqua bidest. ad	100,0 ml	Aqua bidest. ad	100,0 ml

3. Gelzubereitung und Elektrophorese

Das Gemisch für das Trenngel besteht aus gleichen Teilen der Lösungen A–D, für einen Ansatz von 16 Röhrenchen aus je 10,0 ml. Dieses 6%ige Gel, das auch als Verschußgel dient, polymerisiert in 60 min. Die Zwischenschaltung eines Sammelgels entfällt auch hier. Das kontinuierliche Originalverfahren der Autoren dagegen, das in die Versuchsreihe miteinbezogen wurde, sieht ein „zweidimensionales“ Trenngel vor (s. Diskussion). Trennzeit: 3,5 Std bei einer Stromstärke von 3 mA je Röhrenchen. Färbetechnik wie vorstehend.

Ergebnisse und Diskussion

Die Angaben, daß die kontinuierliche der diskontinuierlichen PAA-Gel-Elektrophorese hinsichtlich des Auflösungsvermögens der einzelnen Proteinkomponenten mindestens gleichwertig [1, 14] oder ihr sogar überlegen ist [37], haben sich für den Bereich der Haptoglobinglobuline *nicht* bestätigen lassen (so auch Woodworth u. Mitarb. [36]). Das nach Gelporengröße, pH-Wert und Pufferzusammensetzung diskontinuierliche Trennsystem bewirkt offenbar durch seinen besseren Konzentrierungs- und Molekularsiebeffekt eine schärfere Startzone der aufzutrennenden Substanz und damit günstigere Trennungsergebnisse. Schon ein diskontinuierliches Puffersystem *allein* hat sich sowohl im Stärkegel [23] als auch im PAA-Gel [39] anderen Puffersystemen als überlegen erwiesen.

Ferner ließ sich zeigen, daß die hier verwendeten verschiedenen polymerisations-einleitenden Katalysatoren sich nicht störend auf den Haptoglobinnachweis aus-

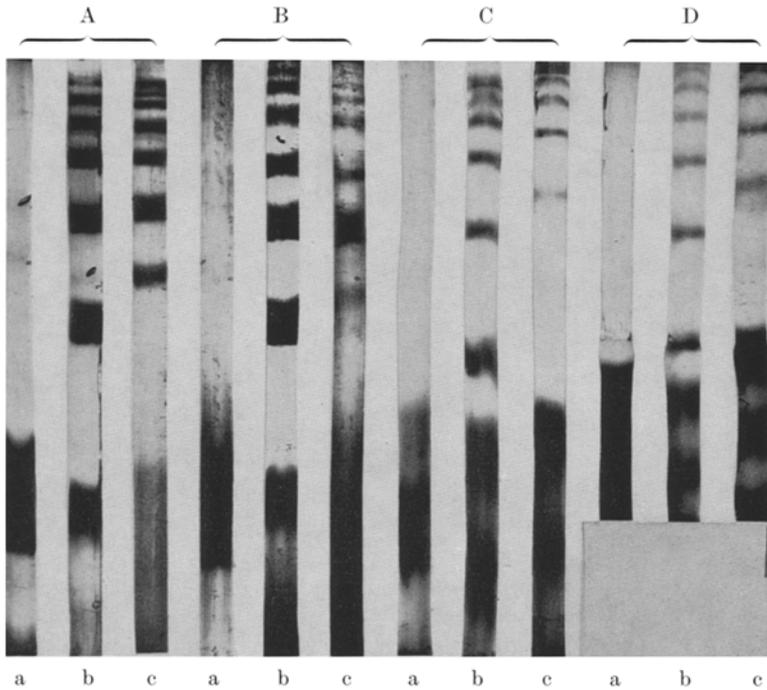


Abb. 2 A—D. Auftrennung dreier Normalseren in zwei verschiedenen diskontinuierlichen PAA-Gel-Elektrophoresen (A und B) und einer kontinuierlichen Elektrophorese mit „eindimensionalem“ (C) und „zweidimensionalem“ (D) Trenngel. *a* Hp 1—1; *b* Hp 2—1; *c* Hp 2—2. Benzidinfärbung

wirken, die von Wieme [53] geforderte Katalysatorfreiheit des Gels für derartige Untersuchungen also nicht Bedingung ist. Selbst das Kaliumferricyanid, das bekanntlich Häm- in Häminglobin umwandelt, beeinflusst nicht dessen Aktivität als Katalysator bei der Benzidinfärbung.

Abb. 2 zeigt von links nach rechts die Auftrennung von 4 Normalseren mit den 3 Haptoglobintypen, und zwar bei A: diskontinuierliche PAA-Gel-Elektrophorese in Anlehnung an Davis [8] und Ornstein [21]; B: Disk-Elektrophorese nach Schleyer u. Schaible [30]; C: kontinuierliche PAA-Gel-Elektrophorese nach Abraham u. Mitarb. [1], modifiziert als „eindimensionales“ Verfahren; D: kontinuierliche, „zweidimensionale“ Elektrophorese (Originalverfahren nach Abraham u. Mitarb. mit kürzerer Laufstrecke).

Ein Vergleich der Muster zeigt deutlich, daß bei Anwendung der Disk-Elektrophorese die Haptoglobinbanden insgesamt etwas weniger auseinandergezogen, dafür aber breiter, schärfer konturiert und vor allem — das scheint der wichtigste Faktor zu sein — wesentlich besser vom freien Hämoglobin abzugrenzen sind. Bei der kontinuierlichen Elektrophorese erscheinen die Banden trotz erhöhter Hämoglobin- und Proteindosis etwas schwächer angefärbt. Wahrscheinlich ist die Hämoglobin-Bindungsfähigkeit des Haptoglobins nicht groß genug, so daß sie einer gewissen Diffusionsauswaschung während der Elektrophorese unterliegt. Die Auftrennung im kontinuierlichen „zweidimensionalen“ Trenngel bringt für die Auf-

gliederung der Haptoglobinglobuline keine Vorteile. Im übrigen unterscheidet sich die 1. und 2. Dimension des Trenngels nicht, wie bei der Disk-Elektrophorese, in der Gelkonzentration, die für die Proteinwanderung etwa 4,5—7,5% betragen soll, sondern lediglich im Quervernetzungsgrad (Comonomergehalt). Dies bringt nur geringe Unterschiede im Auflösungsvermögen. Insofern wäre das „eindimensionale“ kontinuierliche Trennsystem für die Haptoglobindifferenzierung besser.

Es erscheint nach wie vor zweckmäßig, zur sicheren Typendifferenzierung die selektive Hämoglobin-Haptoglobin-Komplexanfärbung mit der Benzidintechnik den üblichen Proteinanfärbungen vorzuziehen. Eine kombinierte Anfärbung der gesamten Gelsäule mit Amidoschwarz 10B und o-Dianisidin [17] zur gleichzeitigen Differenzierung der Hp-, Ge-Globulin- und Transferrin-Serumgruppen [1, 9, 17, 22, 31] ist zweifellos bestechend. Die Diagnostik gehört jedoch in die Hand des Geübten, ist zusätzlich an eine densitometrische Auswertung gebunden und offenbar auch nicht völlig irrtumsfrei, zumal bei kombinierter Färbung nur ein Teil der vorhandenen Hp-Banden sichtbar wird. Der andere Teil ist wegen zu geringer Konzentration nicht darstellbar oder wird von anderen Proteinen überdeckt. Die Identifizierung der Serumbanden und ihre Zuordnung zu definierten Proteinen wird gelegentlich auch durch Veränderung der Rf-Werte im Pherogramm erschwert [9, 22].

Für die Praxis ergibt sich die Brauchbarkeit aller drei Elektrophoreseverfahren, also auch des in der Technik hier wesentlich vereinfachten kontinuierlichen Trennsystems, wenn es nur der Routinediagnostik und nicht genetischen Studien, etwa zum Nachweis von Typenvarianten, dienen soll. Allgemein bietet das Gelsäulensystem im Glasröhrchen als Vorteile gegenüber anderen PAA-Gel-Elektrophoresen: die Einfachheit der Apparatur, die ohne Zwischenschaltung eines Impfträgers aufzutragende geringe Serummenge, unmittelbaren Kontakt zwischen Gel und Puffer, das Fehlen von Austrocknungserscheinungen des Gels und schließlich die Unabhängigkeit von kostspieligen Kühlvorrichtungen.

Die Zahl der bekannten Zonen des Hp-Bandenspektrums ist nicht größer als beispielsweise bei der 18stündigen Stärkegelelektrophorese im Tris-Boratpuffer nach Robson u. Mitarb. [27] oder bei der Methodik der vertikalen Stärkegelelektrophorese von Smithies [34]. Von der Stärkegelelektrophorese unterscheidet sich die Disk-Elektrophorese jedoch durch ein wesentlich höheres Auflösungsvermögen der Banden schon nach kurzer Trennzeit, durch glasklare Transparenz des Gels und die einfache und nahezu ausnahmslos zuverlässige Typendifferenzierung. Der wesentliche Vorteil liegt aber darin, daß weder ein zu hoher Hämoglobinanteil im Haptoglobin-Hämoglobin-Komplex noch eine zu reichliche Beimischung der Röhrchen sich nachteilig auswirken. Man erhält allenfalls etwas überfärbte, jedoch immer scharf getrennte Banden. Im Gegenteil, eine Vollbeladung des Haptoglobins ist unerlässlich für die Reproduzierbarkeit einer Mindestzahl scharfer, gleichmäßiger Banden. In diesem Zusammenhang sei auf den Vergleich der Protein- und Benzidinfärbung an gleichen Seren [1] hingewiesen, bei dem sich zeigte, daß die Haptoglobinpolymeren des 2—2- und des 2—1-Typs je nach Beladungszustand bis zu 3 Moleküle Hämoglobin je Haptoglobinmonomer zu binden vermögen. Ähnliche Ergebnisse erbrachten die Untersuchungen von Zwaan u. Mitarb. [38]. Dies scheint mit einer der Gründe zu sein, weshalb die in der Literatur angegebenen Zahlen der Hp-Banden der 2—1- und 2—2-Typen so außerordentlich stark differieren, und zugleich ein Beweis dafür, daß die Anzahl der Banden nicht

nur vom Auflösungsvermögen des Trägermediums, sondern entscheidend auch vom Sättigungsgrad der Haptoglobine abhängig ist. Damit entfällt übrigens die von Schleyer und Schaible irrtümlich gezogene Folgerung, daß bei den Hp-Typen 2—1 und 2—2 mit der PAA-Elektrophorese mehr als die übliche Zahl von Banden zu entdecken sei.

Eine die Typendiagnostik erschwerende Schlierenbildung, wie sie bei Hämoglobinüberschuß in der Stärkegelelektrophorese auftreten kann, gibt es in der Disk-Elektrophorese praktisch nicht. Das überschüssige, die Bindungskapazität des Haptoglobins überschreitende Hämoglobin wandert stets zur Anode, ohne das Hp-Bandenspektrum wesentlich zu beeinträchtigen. Aus diesem Grunde eignet sich die Disk-Elektrophorese besonders in der forensischen Serologie zum Haptoglobinnachweis in stark hämolysierten Bluten und in Blutspuren. Über derartige Versuche wird in Kürze berichtet werden.

Literatur

1. Abraham, K., Schütt, K., Müller, J., Hoffmeister, H.: Kontinuierliche Polyacrylamid-Elektrophorese. I. Untersuchungen an Normalseren. *Z. klin. Chem.* **8**, 92—98 (1970).
2. Akroyd, P.: Acrylamide gel slab electrophoresis in a simple glass cell for improved resolution and comparison of serum proteins. *Analyt. Biochem.* **19**, 399—410 (1967).
3. Baumgarten, A.: Micro method of haptoglobin typing using acrylamide gels. *Nature (Lond.)* **199**, 490—491 (1963).
4. Biel, H., Heimbürger, N., Kraft, D., Kranz, Th., Schmidtberger, R.: Einige neuere analytische Methoden zur Charakterisierung der Plasmaproteine. *Behringwerk-Mitt.* **43**, 1—82 (1964).
5. — Zwisler, O.: Elektrophorese in horizontalem Polyacrylamidgel. II. Die Trennung der Komponenten des Humanserums bei verschiedenen Trennstrecken. *Z. klin. Chem.* **5**, 79—80 (1967).
6. Clarke, J. T.: Simplified "disc" (polyacrylamide gel) electrophoresis. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **121**, 428—436 (1964).
7. Cleve, H., Herzog, P.: Phenotypic variations of haptoglobin Johnson types. *Human-genetik* **7**, 218—224 (1969).
8. Davis, B. J.: Disc electrophoresis — II. Method and application to human serum proteins. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **121**, 404—427 (1964).
9. Felgenhauer, K., Bach, S., Stammner, A.: Elektrophorese von Serum und Liquor cerebrospinalis in Polyacrylamidgel. *Klin. Wschr.* **45**, 371—377 (1967).
10. Ferris, T. G., Easterling, R. E., Budd, R. E.: Determination of haptoglobin types by electrophoresis in acrylamide gel. *Clin. chim. Acta* **8**, 792—793 (1963).
11. Gordon, A. H.: *Electrophoresis of proteins in polyacrylamide and starch gels.* Amsterdam: North-Holland Publ. Comp. 1971.
12. Hamaguchi, H.: Control of haptoglobin metabolism. I. Demonstration of hemoglobin-haptoglobin complex and hemoglobin-haptoglobin subunits on disc electrophoresis. *Proc. Jap. Acad.* **42**, 1099—1103 (1966).
13. Hermans, P. E., McGuckin, W. F., McKenzie, B. F., Bayrd, E. D.: Electrophoretic studies of serum proteins in cyanogum gel. *Proc. Mayo Clin.* **35**, 792—807 (1960).
14. Hjerten, S., Jerstedt, S., Tiselius, A.: Some aspects of the use of "continuous" and "discontinuous" buffer systems in polyacrylamide gel electrophoresis. *Analyt. Biochem.* **11**, 219—223 (1965).
15. Hoppe, H. H.: Diskussionsbemerkung, *Tagg. Ges. Forens. Blutgruppenkunde, Travemünde* 1969.
16. Javid, J.: Haptoglobin 2—1 Bellevue, a haptoglobin β -chain mutant. *Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.)* **57**, 920—924 (1967).

17. Krüpe, M., Schmitt, J.: Die Haptoglobin-, Gc-Globulin- und Transferrin-Serumgruppen des Menschen, ihre Differenzierung mit der vertikalen Polyacrylamidgel-Elektrophorese. *Z. Immun.-Forsch.* **137**, 307—313 (1969).
18. Matson, C. F.: Polyacrylamide gel electrophoresis. A simple system using gel columns. *Analyt. Biochem.* **13**, 294—304 (1965).
19. Maurer, H. R.: Disc electrophoresis and related techniques of polyacrylamide gel electrophoresis, Berlin: de Gruyter 1971.
20. Nandi, M., Lewis, G. P.: Thin-layer acrylamide gel electrophoresis. *J. clin. Path.* **23**, 727—729 (1970).
21. Ornstein, L.: Disc electrophoresis. I. Background and theory. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **121**, 321—349 (1964).
22. Pastewka, J. V., Ness, A. T., Peacock, A. C.: Electrophoretic patterns of normal human serums by disc electrophoresis in polyacrylamide gel. *Clin. chim. Acta* **14**, 219—226 (1966).
23. Poulik, M. D.: Starch gel electrophoresis in a discontinuous system of buffers. *Nature (Lond.)* **180**, 1477—1479 (1957).
24. Prokop, O., Bundschuh, G.: Die Technik und die Bedeutung der Haptoglobine und Gm-Gruppen in Klinik und Gerichtsmedizin. Berlin: de Gruyter 1963.
25. Raymond, S., Weintraub, L.: Acrylamide gel as a supporting medium for zone electrophoresis. *Science* **130**, 711 (1959).
26. — Acrylamide gel electrophoresis. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **121**, 350—365 (1964).
27. Robson, E. B., Glen-Bott, A. M., Cleghorn, T. E., Harris, H.: Some rare haptoglobin types. *Ann. hum. Genet.* **28**, 77—84 (1964).
28. Serafini, N. A.: Nota sull'applicazione della tecnica dell'elettroforesi a disco in gel di acrylamide per l'identificazione dei fenotipi aptoglobinici. *Acta med. rom.* **4**, 448—454 (1966).
29. Schaible, P.: Versuche zur Darstellung der Haptoglobintypen durch Acrylamidgel-Elektrophorese. Dissertation, Marburg 1967.
30. Schleyer, F., Schaible, P.: Darstellung der Haptoglobintypen durch Elektrophorese in Polyacrylamidgel. *Z. klin. Chem.* **5**, 32—34 (1967).
31. Schütt, K.-H., Hoffmeister, H.: Kontinuierliche Polyacrylamid-Elektrophorese. II. Möglichkeiten zur Diagnose von malignen und entzündlichen Erkrankungen der Lunge. *Z. klin. Chem.* **9**, 201—206 (1971).
32. Sheridan, J. W., Kenrick, K. G., Margolis, J.: Phenotypic expression of the Hp²/Hp¹ genotype. *Biochem. biophys. Res. Commun.* **35**, 474—477 (1969).
33. Singh, P. J.: A revised staining procedure for haptoglobins. *Vox Sang. (Basel)* **12**, 78—79 (1967).
34. Smithies, O.: Zone electrophoresis in starch gels: group variations in the serum proteins of normal human adults. *Biochem. J.* **61**, 629—641 (1955).
35. Wieme, R.: *Prot. Biol. Fluids, Proceed. 10th Coll. Bruges 1962*, zit. nach Biel.
36. Woodworth, R. Cl., Clark, L. G.: An improved vertical polyacrylamide gel electrophoresis apparatus. *Analyt. Biochem.* **18**, 295—304 (1967).
37. Wright, G. L., Mallmann, W. L.: *Proc. Soc. exp. Biol. (N.Y.)* **123**, 22 (1966), zit. nach Gordon.
38. Zwaan, J., Maki, T. N.: Haptoglobin-haemoglobin complexes studied by polyacrylamide gel electrophoresis. *Nature (Lond.)* **218**, 476—478 (1968).
39. Zwisler, O., Biel, H.: Elektrophorese in horizontalem Polyacrylamidgel. I. Einfluß verschiedener Elektrophoresebedingungen auf die Auflösung von Humanserum. *Z. klin. Chem.* **4**, 58—62 (1966).

Dr. med. Reinhard Hilgermann
Institut für Rechtsmedizin der Universität
D-3550 Marburg, Emil Mannkopff-Straße 2
Deutschland