

Eine verbesserte Methode zur Darstellung der Haptoglobintypen aus Blutspuren

Masakazu OYA und Fukutaro TAKABE
Institut für gerichtliche Medizin der
Städtischen Universität Nagoya (Japan)

Eingegangen am 21. Juni 1975

An Improved Method for the Detection of
Haptoglobin Types from Blood Stains

Summary: This paper describes a simple technique for the elimination of excess hemoglobin from blood stain extracts by means of P-cellulose column chromatography, which is applicable to the haptoglobin typing from blood stains.

Zusammenfassung: Es wird ein einfaches Verfahren zur Entfernung des überschüssigen Blutfarbstoffs aus Blutspurenextrakten mittels P-Cellulose-Säulenchromatographie beschrieben, dessen Anwendung für die spurenkundliche Haptoglobintypenbestimmung geeignet ist.

Key words: Spurenuntersuchung, Haptoglobintypenbestimmung - Haptoglobintypenbestimmung, in Blutspuren

Der Gerichtsmediziner kommt ziemlich häufig in die Lage, Haptoglobintypen am getrockneten Blut oder am Blutfleck festzustellen. Zur Zeit sind zwar zahlreiche spurenkundliche Nachweisverfahren der Haptoglobintypen unterbreitet, aber die nachteilige Auswirkung der Hämolyse führt zur Verschmierung der Laufstrecke, die oft die Haptoglobindifferenzierung erschwert, zumal zwischen dem Hp-Typ 2-1 und dem Hp-Typ 2-2. Neuerdings hat sich die vertikale Polyacrylamidgelelektrophorese (Diskelektrophorese) für die Haptoglobintypendarstellung mit ihrer hohen Empfindlichkeit und ihrem großen Auflösungsvermögen als nützlich erwiesen (1, 2). In der vorliegenden Arbeit haben wir versucht, den überschüssigen Blutfarbstoff mit Hilfe einer einfachen Ionenaustauschchromatographie unter Verwendung von P-Cellulose zu entfernen; dadurch haben wir eine einwandfreie diskelektrophoretische Haptoglobintypenbestimmung aus Blutspuren erzielen können.

METHODIK

Je 5 Vollblutproben der 3 Haptoglobintypen wurden in Mengen von 0.1-0.05 ml auf Filterpapier aufgetropft. Dann wurden diese Blutspuren je 1 Tag, 1 Woche und 1 Monat bei Zimmertemperatur aufbewahrt,

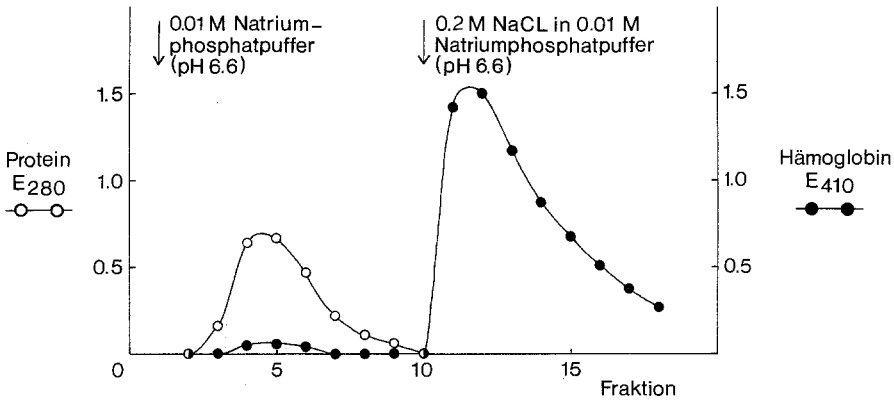


Abb. 1. P-Cellulose-Säulenchromatographie zur Entfernung des Blutfarbstoffs aus dem Extrakt einer Blutspur. Säule: 5x20 mm; Fraktionsvolumen: 0.5 ml. Relativer Proteingehalt (-o---o-): 1/5xExtinktion bei 280 nm; relativer Hämoglobingehalt (-●---●-): 1/20xExtinktion bei 410 nm

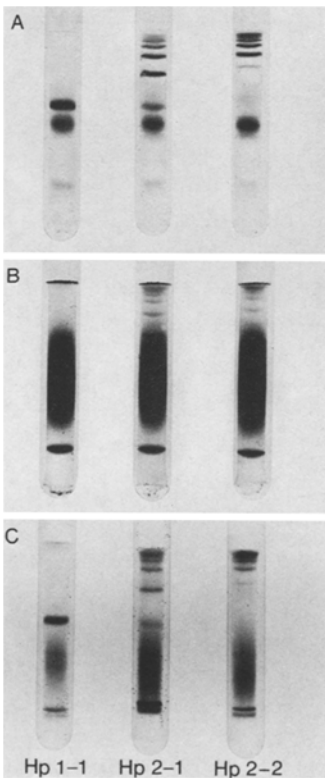


Abb. 2. Diskelektrophoretische Darstellung der drei Haptoglobintypen an Kontrollseren (A), unbehandelten Extrakten von 1 Woche alten Blutspuren (B) und denselben Extrakten nach Entfernung des Hämoglobins (C)

Zur Entfernung des Blutfarbstoffs aus Blutspuren hat sich folgende Technik bewährt: Das hämolytische Blut wird mit 1,0 ml 0.01 M Natriumphosphatpuffer (pH 6.0) extrahiert, wobei der pH-Wert des Extraktes 6.5–6.6 beträgt. Nach Zentrifugation bei 3,000 rpm für 10 min wird das Blutextrakt (ca. 0.7 ml) auf eine kleine Säule (5x20 mm) von P-Cellulose (Pharmacia, Uppsala, Sweden) aufgetragen, die vorher mit 0.01 M Natriumphosphatpuffer (pH 6,6) äquilibriert ist. Die Elution des Extraktes erfolgt mit dem gleichen Puffer, das Eluat wird in Fraktionen von 0.5 ml aufgefangen. Unter diesen Bedingungen kann man das Hämoglobin an die Cellulose adsorbieren (Abb. 1). Das gebundene Hämoglobin läßt sich erst mit 0.2 M NaCl im gleichen Puffer von der Cellulose absondern.

Zur Elektrophorese wurde etwa 0.1 ml vom entfärbten Eluat (Fraktionen 4–6), welches den Hämoglobin-Haptoglobin-Komplex enthalten soll, ohne Zugabe einer frischen Hämoglobininlösung verwendet. Wir führten die vertikale Diskelektrophorese hauptsächlich nach der Methode von CLARKE (3) durch mit einer Modifikation, die Konzentration des Acrylamid-Monomers auf 6.5 % zu stellen. Für die Herstellung der Gelsäulen wurden Glasröhrchen von 5x80 mm verwendet. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte in einem Kühlschrank bei konstantem Strom von 2 mA je Röhrchen für 2 Std. Nach der Elektrophorese wurden die Gelsäulen mit Benzidin und Hydrogenperoxid gefärbt.

ERGEBNISSE

Unser neues Verfahren hat im wesentlichen befriedigende Ergebnisse erbracht, wie in Abb. 2 zu sehen ist. Bei unvorbehandelten Blutspurenextrakten waren die Haptoglobinbanden wegen der störenden Hämoglobinverschmierung der Pherogramme schwer zu identifizieren. Durch den hier angegebenen Hämoglobineliminationsversuch haben wir diese diagnostischen Schwierigkeiten überwinden können, was uns in allen Fällen eine einwandfreie Haptoglobintypisierung aus noch 1 Monat alten Blutspuren erlaubt hat. Unsere Methode kann somit für den forensischen Haptoglobinnachweis in Blutspuren empfohlen werden, insbesondere wenn es sich um eine genügende Blutmenge (mindestens etwa 0.05 ml) handelt.

LITERATUR

1. HILGERMANN, R.: Haptoglobintypenbestimmung mittels vertikaler Säulenelektrophorese in Polyacrylamidgel. *Z. Rechtsmedizin* 70, 16 (1972)
2. HILGERMANN, R.: Vergleichende Untersuchungen zur Empfindlichkeit der Haptoglobintypenbestimmung in verschiedenen Medien unter besonderer Berücksichtigung gealterter Blutproben und von Blutspuren. *Z. Rechtsmedizin* 71, 222 (1972)
3. CLARKE, J.T.: Simplified "disc" (polyacrylamide gel) electrophoresis. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 121, 428 (1964)

Dr. med. Masakazu OYA
Prof. Dr. med. Fukutaro TAKABE
Institut für gerichtliche Medizin
der Städtischen Universität Nagoya
Mizuho-ku, Kawasumi
Nagoya, Japan