

Gleichzeitige Darstellung von EsD, DIA, GLO und UDPGP in einem Stärkeblock

Peter Stöhlmacher und Wilhelm Haferland

Institut für Gerichtliche Medizin des Bereiches Medizin der Wilhelm-Pieck-Universität Rostock,
Friedrich-Engels-Str. 108, DDR-2500 Rostock, Deutsche Demokratische Republik

Simultaneous Representation of EsD, DIA, GLO, and UDPGP in a Starch Block

Summary. A report is given on the simultaneous representation of four enzyme systems from the human testicle. GLO and diaphorase types could be reproduced well. This applies in principle also to EsD, but the incubation time should not exceed 2–3 min because the background fluorescence then becomes increasingly intense. Two different patterns were obtained for the UDPGP, but they could not be separated regularly.

Key words: Simultaneous representation, testicle enzymes – EsD, DIA, GLO, UDPGP – Identification, tissue isoenzymes – Tissue isoenzymes, identification

Zusammenfassung. Es wird über die gleichzeitige Darstellung von 4 Enzymsystemen aus menschlichen Hoden berichtet. GLO- und Diaphorase-Typen waren sehr gut reproduzierbar. Das gilt prinzipiell auch für EsD; dabei sollte eine Inkubationszeit von 2–3 min nicht überschritten werden, weil sich die Untergrundfluoreszenz zunehmend intensiviert. Von der UDPGP wurden 2 differente Muster angezeigt; jedoch gelang ihr Nachweis nicht regelmäßig.

Schlüsselwörter: Simultandarstellung, Hodenenzyme EsD, DIA, GLO, UDPGP – Identifikation, Gewebeenzyme – Gewebeenzyme, Identifikation

Das Spektrum der Enzym polymorphismen, die in der Praxis der biologischen Spurenkunde, der Identifikation und der serologischen Paternitätsuntersuchungen eingesetzt werden können, wurde in den letzten 10 Jahren wesentlich erweitert.

Durch die gleichzeitige Auftrennung mehrerer Enzym systeme in einem Gelblock kann die zeitliche, technisch-materielle und organisatorische Belastung der Laboratorien reduziert werden. Auf der anderen Seite ist einzuräumen, daß Simultanverfahren Kompromißlösungen darstellen, die mehr oder minder große Abstriche an der Qualität der Darstellung des einen oder anderen Enzyms und an

der Reproduzierbarkeit der Zymogramme einschließen. Die Praxis zeigt dennoch, daß sich bei mehreren Systemen der kombinierte Arbeitsgang bewährt hat (Thoma u. Brinkmann 1971; Stöhlmacher u. Haferland 1976; Radam 1977).

Material und Methode

1.1 Gewebeaufbereitung

Hoden menschlicher Leichen wurden bis 100 h p.m. entnommen, von Hüllen und Nebenhoden befreit und in einem Becherglas mindestens 24 h bei -20°C gefrosten. Nach dem Zerreiben des tief gefrostenen Gewebes ließen wir das Material 1 h bei $+4^{\circ}\text{C}$ vollständig auftauen. Der durch Zentrifugieren (30 min; 4000 U/min) gewonnene wäßrige Überstand wurde bis zum Verimpfen tief gefrosten.

1.2 Elektrophoresebedingungen

Brückenpuffer: In 1000 ml Aqua bidest. waren 10,73 g Tris, 10,28 g Maleinsäure, 3,26 g Chelaplex III und 1,8 g Magnesiumchlorid-6-hydrat gelöst. Ca. 5 g Natriumhydroxid dienten zur Einstellung auf pH 7.2. Gelpuffer-Stammlösung: 250 ml Aqua bidest. enthielten 6,1 g Tris und 6,8 g Histidinmonohydrochlorid; pH 7.8. 50 ml Gelpuffer-Stammlösung wurden mit Aqua bidest. auf 400 ml aufgefüllt. Nach Zugabe von 40–41 g partiell hydrolysiertes Kartoffelstärke bereiteten wir einen luftblasenfreien Gelblock von $34 \times 14 \times 0,7$ cm. Als Gelbrücken dienten 3 mm dicke Viscoseschwammtücher. Das Verimpfen der Gewebeeextrakte erfolgte mit FN8-Papierplättchen (7×5 mm) 10 cm anodenwärts auf der Kathodenseite. Das dreiteilige Kathodengefaß enthielt unverdünnten Brückenpuffer. Im zweiteiligen Anodentrog war der Brückenpuffer 2:1 mit Aqua bidest. verdünnt. Die horizontale Elektrophorese im Kühlschrank bei $+4^{\circ}\text{C}$ dauerte 16 h. Bei 320 V Klemmenspannung wurden anfangs etwa 60 mA angezeigt.

1.3 Gelaufreinigung zur Inkubation

Der entnommene Gelblock wurde zunächst unmittelbar entlang der Impfreihe, dann 9,5 cm anodenwärts derselben und parallel dazu durchtrennt. Von den drei so entstandenen Gelteilen wurde das kathodenwärts gelegene verworfen. Den mittleren (Block A) und den anodenwärts befindlichen Stärkeblock (Block B) haben wir dann horizontal so durchtrennt, daß sich jeweils eine ca. 4 mm dicke obere Schicht von der unteren abheben ließ.

1.4 Zymogramntechnik

1.4.1 Esterase D (EsD). Inkubiert wurde die untere Gelschicht des Blockes A (Hopkinson et al. 1973). Eine Lage Filterpapier war mit folgender Lösung durchtränkt: In 2 ml Aceton haben wir etwa 1–2 mg 4-Methylumbelliferylacetat gelöst und 4 ml 0,05 M Acetatpuffer, pH 5,2, hinzugefügt. Nach 2–3 min wurden die Spots unter dem UV-Licht abgelesen.

1.4.2 NADH-Diaphorase (DIA). Wir haben dafür die untere Gelschicht des Blockes A, die vorher zur Detektion der EsD verwendet wurde, nochmals inkubiert (Hopkinson et al. 1970). Agar-sandwichtechnik: 25 ml 0,1 M Tris-HCl-Puffer (pH 8,4) enthielten 20 mg NADH- Na_2 , 8 mg MTT und 2,5 mg DCIP. Inkubation 2 h bei $+37^{\circ}\text{C}$. Orte der Enzymaktivität stellten sich blauviolett bei grünlich-bläulichem Untergrund dar. Durch anschließendes Bedecken mit 2 Lagen Filterpapier, das mit 1 N HCl getränkt war, ließ sich der Untergrund aufhellen.

1.4.3 Glyoxalase I (GLO). Zur Detektion wurde die untere Gelschicht des Blockes B verwendet (Kömpf et al. 1975). Enzymreaktion: Wir haben das Gel mit 2 Lagen Filterpapier bedeckt und mit 10 ml 0,25 M Phosphatpuffer (pH 6,8), der 16 mg reduziertes Glutathion und 6 Tropfen Methylglyoxal (40%ige Lösung in Glycerin) enthielt, getränkt. Einwirkung ca. 45 min bei $+37^{\circ}\text{C}$. Farbreaktion: Agarsandwichtechnik; im 25 ml 0,1 M Tris-HCl-Puffer (pH 8,4) waren 10 mg MTT und 6 mg DCIP gelöst. Orte der Enzymaktivität erschienen nach ca. 30 min grünlich-bläulich auf dunkelvioletterm Grund.

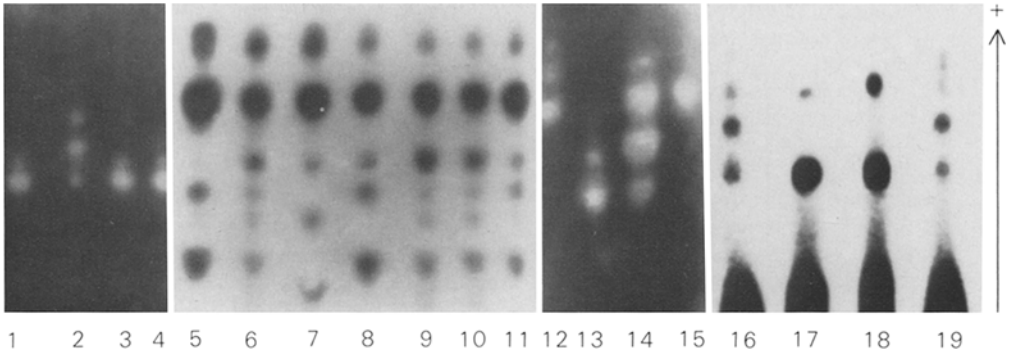


Abb. 1. 1-4: Hoden-EsD. Von links nach rechts: Typ 1, 2-1, 1, 1. 5-11: DIA menschlicher Hodenextrakte. Nachweis vier verschiedener Phänotypen der DIA₃. 12-15: Hoden-GLO. Von links nach rechts: Typ 2, 1, 2-1, 2. 16-19: UDPGP menschlicher Hoden. Darstellung von zwei verschiedenen Phänotypen

1.4.4 Uridindiphosphoglucose-Pyrophosphorylase (UDPGP). Wir verwendeten die obere Gel-schicht des Stärkeblocks A. Agarsandwichtechnik: Es waren in 25 ml 0,2M Tris-HCl-Puffer (pH 7,8) 0,15 ml 1 M MgCl₂, 15 mg Na-Pyrophosphat, 12 mg UDPG, 10 mg NADP, 10 µl PGluM (2 mg/ml), 10 µl G6P-DH (1 mg/ml), 5 mg MTT, 2 mg PMS und eine Spur G-1,6-P₂ enthalten. Nach einer Reaktionszeit von 1 h kamen die blauviolettten Spots auf gelblich-gräulichem Untergrund zur Darstellung.

Ergebnisse und Diskussion

In Abb. 1 (1-4) sind die beobachteten EsD-Phänotypen dargestellt. Eine Inkubationszeit von 2-3 min sollte nicht wesentlich überschritten werden, da sich die unspezifische Gelfluoreszenz zunehmend intensiviert.

Phänotypen der gonadenspezifischen Diaphorase (Abb. 1; 5-11) und der Glyoxalase I (Abb. 1; 12-15) waren mit dieser Kompromißlösung sehr gut reproduzierbar darzustellen. Der eindeutige Nachweis von zwei differenten Mustern der Hoden-UDPGP (Abb. 1; 16-19) gelang uns, wenn auch nicht regelmäßig, erstmalig mit diesem System. Einen eventuell zu postulierenden dritten Phänotyp konnten wir unter 47 Hodenproben jedoch nicht ausmachen. Sowohl frische als auch ältere Homogenate zeigten beide Muster an.

Literatur

1. Hopkinson DA, Corney G, Cook PJJ, Robson EB, Harris H (1970) Genetically determined electrophoretic variants of human red cell NADH-diaphorase. *Ann Hum Genet (Lond)* 34: 1-10
2. Hopkinson DA, Mestriner MA, Cortner J, Harris H (1973) Esterase D: a new human polymorphism. *Ann Hum Genet (Lond)* 37: 119-137
3. Kömpf J, Bissbort S, Gussmann S, Ritter H (1975) Polymorphism of red cell glyoxalase I. A new genetic marker in man. *Hum Genet* 27: 141-143
4. Radam G (1977) Methoden und Daten zur Anwendung genetischer Enzym polymorphismen in Gerichtsmedizin und Humangenetik. In: *Fortschritte der Hämatologie*, Bd 4, JA Barth, Leipzig, S 185-307

5. Stöhlmacher P, Haferland W (1976) Darstellung der erythrozytären EsD- und GLO-Phänotypen in einem Stärkegel. Arbeitstagung der gerichtsmedizinischen Institute Rostock und Greifswald
6. Thoma G, Brinkmann B (1971) Auftrennung und Anfärbung von vier Enzym polymorphismen in einem Stärkeblock. Jahrestagung der Gesellschaft für Forensische Serologie

Eingegangen am 24. Februar 1981