

Quantitative Bestimmungen von Hp, Pi, Tf und Gc aus gelagerten Blutspuren

W. Schwerd und J. Groß

Institut für Rechtsmedizin der Universität Würzburg, D-8700 Würzburg, Bundesrepublik Deutschland

Quantitative analysis of Hp, Pi, Tf and Gc in blood stains

Summary. Quantitative analysis of serum proteins in blood stains by rocket immunoelectrophoresis showed the following results: Long elution times in processing blood stains do not produce a significantly higher yield of serum proteins in stains, and they increase the risk of structural alteration of protein molecules. The amount of proteins detected decreases with increasing age of blood stains. Some proteins are already altered in stains after a short storage time and are no longer useful for phenotyping. Our results confirm that blood stain material should be processed as soon as possible.

Key words: Quantitative (rocket-) immunoelectrophoresis – Blood stains, rocket-immunoelectrophoresis

Zusammenfassung. Unsere Versuche mit der Raketen-Immunelektrophorese zum quantitativen Nachweis spezifischer Proteine in Blutspuren haben folgende Ergebnisse erbracht: Lange Elutionszeiten bei der Aufarbeitung von Blutspuren erbringen keine nennenswert höhere Ausbeute an Serumproteinen und erhöhen aber die Gefahr von Strukturveränderungen der Eiweißmoleküle. Mit zunehmender Lagerungszeit von Blutspuren verringert sich die mit der o. g. Methode nachweisbare Proteinmenge kontinuierlich. Ein Teil der erfaßbaren Proteine ist bereits nach kurzer Zeit alteriert und daher für die Phänotypisierung nicht mehr geeignet. Durch die Versuche ist erneut belegt, daß Spurenmaterial so schnell wie möglich untersucht werden sollte.

Schlüsselwörter: Blutspuren, quantitative Immunelektrophorese – Raketen-immunelektrophorese, Blutspuren

Einleitung

Genetisch variabel geprägte Serumproteine werden in der rechtsmedizinischen Praxis elektrophoretisch aufgetrennt und so deren Phänotypen festgestellt. Da diese Proteine auch in Blutspuren auf Stoff aufzufinden sind, war es unser Ziel festzustellen, welcher Anteil der ursprünglich in der Blutspur auf Baumwoll-

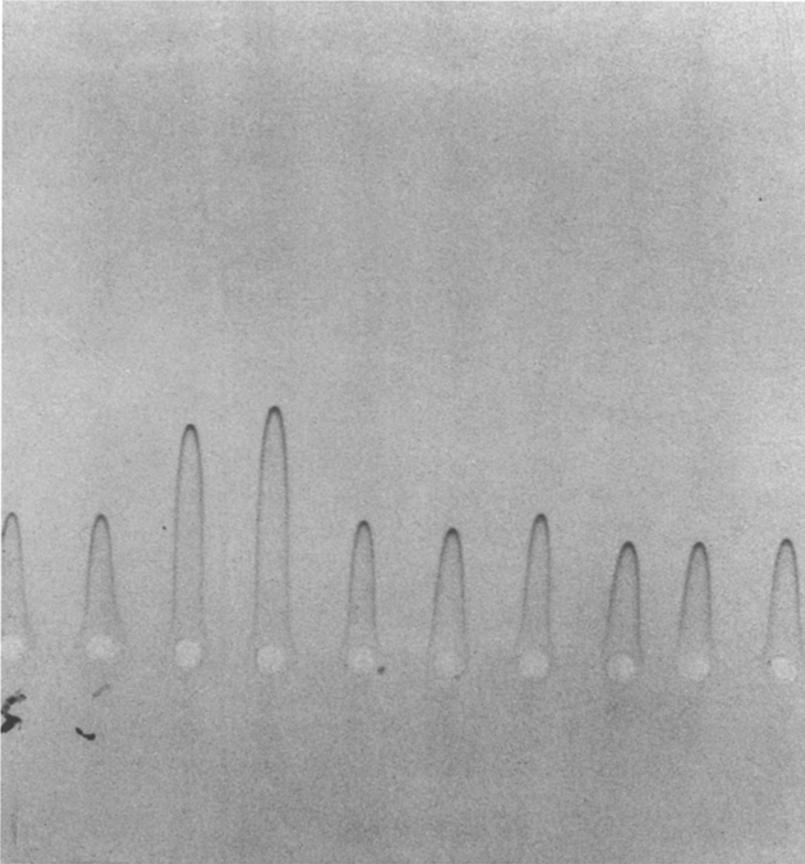


Abb. 1. Raketen-Immun-Elektropherogramm nach Anfärben mit Chromatin-Blau

stoff vorhandenen Proteine herausgelöst werden kann und so für eine Auftrennung in Phänotypen zur Verfügung steht (Wiederfindungsrate). Mit der erstmals von Laurell beschriebenen „Raketen-Immunelektrophorese“, die von anderen Autoren auch als „Elektro-Immuno-Essay“ bzw. „Elektro-Immuno-Diffusion“ bezeichnet wird, können quantitative Proteinbestimmungen ohne größeren technischen Aufwand durchgeführt werden (1–5).

Die Raketen-Immunelektrophorese

Das Prinzip der Methode beruht auf einer Antigen-Antikörper-Präzipitation während der Wanderung der Proteine im elektrischen Gleichstromfeld von einer Elektrode zur anderen. Das Gel enthält den Antikörper. Dadurch, daß Antigen im Überfluß auf das Gel aufgebracht wird, entsteht zunächst nur eine partielle Präzipitation. Diese Immunkomplexe bleiben wasserlöslich. Zur Anode hin bilden sich miteinander vernetzte Immunkomplexe in Form eines raketenförmigen und wasserunlöslichen Präzipitatbogens, der um so höher wird, je höher die Proteinkonzentration in der Probe ist (Abb. 1).

Die quantitative Bestimmung gelingt mit einem Kalibrator, d. h. mit einer käuflichen Serumprobe mit definierter Menge des zu untersuchenden Proteins. Mit entsprechenden Verdünnungen kann man anhand der Präzipitationshöhen mit einer Eichkurve die Proteinmengen bestimmen.

Wir führten die Raketen-Immunelektrophorese in einprozentigen Agarosegelen über Nacht durch, weil nach unseren Erfahrungen die Bandschärfe bei Diffusionszeiten von rund 16 Std. optimal ist. Zur besseren Handhabung wurden die Gele auf Trägerfolien gegossen. Der verwendete Barbitalpuffer hatte eine Ionenstärke von $\mu=0,02$ und einen pH-Wert von 8,6. Nach der Diffusion wurden die Gele gewaschen, mit Coomassie gefärbt und unter Sichtkontrolle entfärbt.

Die Versuche wurden mit dem Blut von vier Personen durchgeführt. Die Ausgangskonzentrationen der vier genannten Proteine wurden jeweils am Frischblut bestimmt und gleich 100% gesetzt. Mit je 20 μ l Blut wurden auf Baumwollstoff Spuren angefertigt, bei Raumtemperatur gelagert und nach 4 Tagen, 6 und 12 Wochen untersucht. Eluiert wurde mit der 10-fachen Menge A. dest. im Vergleich zu der Spur.

Einfluß unterschiedlicher Elutionszeiten auf die Wiederfindungsrate

Abbildung 2 zeigt die prozentualen Durchschnittswerte für die einzelnen Proteine nach der Elutionsdauer von einer, zwei, sechs und vierundzwanzig Stunden. Die Blutspuren waren alle 4 Tage trocken bei Zimmertemperatur gelagert worden. Bei allen Proteinen wurden für die ersten drei Elutionszeiten Wiederfindungsraten von rund 70% gemessen. Die Verlängerung der Elutionsdauer auf 24 Std erhöhte die Wiederfindung bei Hp, Pi und Gc nur um knapp 10%. Bei den Transferrinen wurden hingegen bei allen Bestimmungen an den vier Tage alten Spuren Werte von über 100% des Ausgangswertes gemessen. Dies ließ uns zunächst an einen technischen Fehler denken, den wir jedoch durch Wiederholung der Messung ausschließen konnten. Anscheinend kommt es bei den Transferrinen zu Strukturveränderungen der Moleküle mit relativer Zunahme der Antikörper-Bindungsstellen.

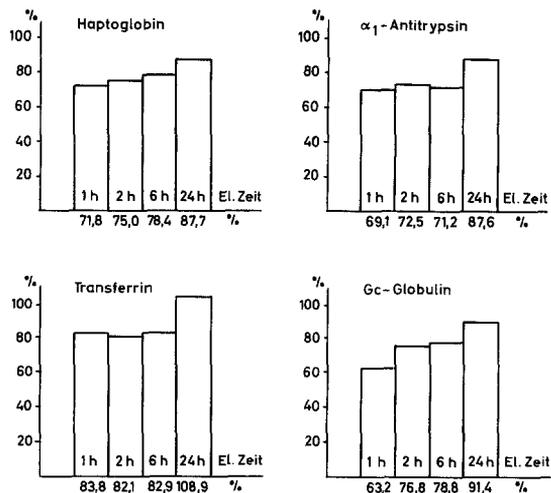


Abb. 2. Einfluß unterschiedlicher Elutionszeiten auf die Wiederfindungsrate von Hp, Pi, Tf und Gc aus vier Tage alten Blutspuren

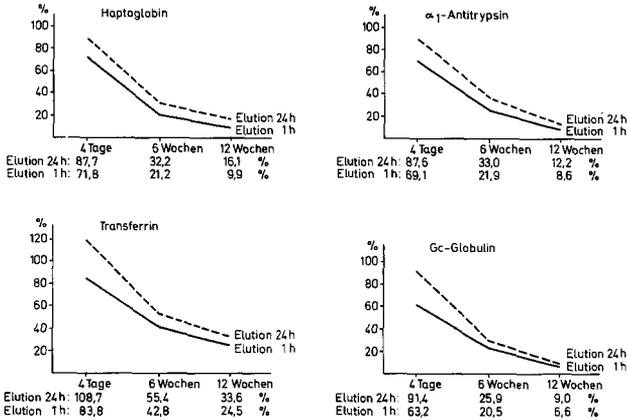


Abb. 3. Einfluß längerer Lagerung der Blutspuren auf die Wiederfindungsrate von Hp, Pi, Tf und Gc

Einfluß längerer Lagerzeiten von Blutspuren auf die Wiederfindungsrate der Proteine

Die Wiederfindungsraten der einzelnen Proteine in 6 und 12 Wochen alten Blutspuren sind in Abbildung 3 dargestellt. Überraschenderweise kam es zu einem etwa parallelen Abfallen der Konzentrationen bei allen vier Proteinen. Die geringste Abnahme war beim Tf festzustellen, was auf das oben beschriebene Phänomen zurückzuführen ist.

Von besonderem Interesse ist jedoch die Beantwortung der Frage, ob die mit der genannten Methode nachgewiesenen Epitope auch erhaltenen Phänotypen entsprechen. Dazu wurden die Phänotypen in der üblichen Weise analysiert. Wir stellten jedoch fest, daß nur die Gc-Typen erhalten geblieben sind.

Über Veränderung der Transferrine allein durch Antrocknung haben wir bereits früher berichtet [6]. Durch Immunoblotting konnte nachgewiesen werden, daß die spezifischen Epitope an den in ihrer Lage veränderten Banden erhalten geblieben sind. Ähnliche Ergebnisse hatten wir auch mit dem α_1 -Antitrypsin (Pi) erhalten.

Danksagung. Herrn Dr. Volker Müller danken wir für Rat und Unterstützung.

Literatur

1. Laurell CB (1961) Crossed immunoelectrophoresis in agarosegel. *Anal Biochemie* 10:358–361
2. Laurell CB (1966) Quantitative estimation of proteins by electrophoresis in agarosegel containing antibodies. *Anal Biochemie* 15:45–52
3. Becker W, Sieber A (1975) Methoden der qualitativen und quantitativen Immunelektrophorese. Behring-Institut, Frankfurt
4. Hallmann L (1980) *Klinische Chemie und Mikroskopie* Stuttgart-New York, S. 672 ff
5. Weeke B (1972) Quantitative Immunelektrophorese I, „Raketenelektrophorese“. *Das Ärztliche Laboratorium* 18, 12 ff.
6. Schwerd W, Müller V (1989) Fehlerquellen bei der Bestimmung von Transferrin aus gefrorenen Blutproben und aus Blutspuren. *Z Rechtsmed*

Eingegangen am 2. Juli 1988