

Z. klin. Chem. u. klin. Biochem.

8. Jg., S. 92—98, 1970

Kontinuierliche Polyacrylamid-Elektrophorese I. Untersuchungen an Normalseren

Von K. ABRAHAM¹⁾, K. SCHÜTT¹⁾, I. MÜLLER¹⁾ und H. HOFFMEISTER

I. Med. Univ. Klinik, Hamburg und Bundesgesundheitsamt, Abteilung zur Erforschung von Umweltschäden und Zivilisationskrankheiten, Berlin

(Eingegangen am 8. September 1969)

Die kontinuierliche Elektrophorese in Polyacrylamid ermöglichte bei geeigneter Wahl der Porenweite die Auftrennung von Humansenen in mehr als zwanzig Einzelkomponenten. Die Proteinbanden wurden immunologisch identifiziert und quantitativ ausgewertet. Die Werte von 312 Blutspenderseren führten zur Aufstellung von Normalbereichen für 21 getrennte Proteine. Die ermittelten methodischen Fehlerbereiche waren signifikant enger als die Normalbereiche. Die Elektrophorese erlaubte die klare Zuordnung eines Serums zu den genetisch bedingten Haptoglobin- und Gc-Typen. Qualität und Reproduzierbarkeit der Elektrophoresen wurden erreicht durch eine verbesserte Elektrophoreseapparatur und ein neuartiges Gerät zur Querentfärbung der Polyacrylamidgele.

Continuous polyacrylamide electrophoresis I. Studies on normal sera

Human sera were fractionated into more than twenty separate components by continuous electrophoresis in polyacrylamide of the appropriate pore size. The protein bands were identified immunologically and estimated quantitatively. The values from 312 blood donor sera were used to determine the normal ranges for 21 of the separated proteins. The methodical errors were significantly less than the normal ranges. This method permits a clear differentiation between the genetically dependent haptoglobin and Gc-types. The quality and reproducibility of the electrophoresis were achieved by an improved electrophoresis apparatus and a new type of apparatus for the lateral destaining of the polyacrylamide gels.

Polyacrylamid ist zu einem bevorzugten Trägermaterial für diskontinuierliche (1, 2) und kontinuierliche (3) Elektrophoresen geworden. Es weist gegenüber Trägern wie Papier, Cellulose und Stärkegel entscheidende Vorteile auf: Die Porengröße von Polyacrylamid ist reproduzierbar einzustellen und in weiten Grenzen variabel (4). Das Gel ist transparent und selbst für kurzwelliges UV-Licht durchlässig. Adsorption und Elektroosmose spielen für die Trennung keine Rolle (5, 6, 7).

Obgleich sich Serumproteine in der diskontinuierlichen und kontinuierlichen Polyacrylamid-Elektrophorese in mehr als zwanzig Anteile auftrennen lassen, fehlt bisher eine systematische Auswertung der Proteinfractionen für klinisch-diagnostische Zwecke (9). Der Grund dafür ist darin zu suchen, daß besonders die als leistungsfähiger angesehene diskontinuierliche Polyacrylamid-Elektrophorese einen erheblichen Aufwand erfordert. In der vorliegenden Arbeit wird eine technisch einfache, kontinuierliche Polyacrylamid-Elektrophorese vorgestellt, die eine mindestens gleichwertige Trennung von Serumproteinen gewährleistet im Vergleich zur diskontinuierlichen Elektrophorese. Mit dieser Anordnung haben wir eine große Zahl von normalen und pathologischen Seren untersucht. Die mit Normalseren erhaltenen Werte werden hier wiedergegeben.

Material und Methoden

Die im Handel befindlichen gereinigten *Acrylamid-Präparate*²⁾ können direkt verwendet werden. Weniger sauberes Acrylamid wird aus Chloroform umkristallisiert, ungereinigtes N,N-Methy-

lenbisacrylamid aus Aceton. Sollen die Gele ohne Färbung im UV-Licht ausgewertet werden, müssen die beiden Komponenten unbedingt hoch gereinigt vorliegen. Als Katalysator/Redoxsystem haben wir Dimethylaminopropionitril und Ammoniumpersulfat verwendet. Die Polyacrylamid-Gele waren aus einer engmaschigen (E) und einer weitmaschigen Säule (W) zusammengesetzt. Tabelle 1 gibt die Konzentrationen der sechs Grundlösungen wieder, die zur Herstellung der Gelsäulen benutzt werden.

Tab. 1
Zusammensetzung der sechs Grundlösungen zur Herstellung der beiden Gelsäulen

Bezeichnung	Gelöste Substanzen	Lösungsmittel
E I	23,1% Acrylamid	doppelt dest. Wasser
W I	1,6% N,N-Methylenbisacrylamid	doppelt dest. Wasser
E II	23,1% Acrylamid	1 Teil Pufferstamm-lsg.
	0,8% N,N-Methylenbisacrylamid	1,5 Teile doppelt dest. Wasser
	1,6% Dimethylaminopropionitril	
W II	0,8% Dimethylaminopropionitril	1 Teil Pufferstamm-lsg.
		1,5 Teile doppelt dest. Wasser
EW III	0,03% Kaliumferricyanid	doppelt dest. Wasser
EW IV	0,48% Ammoniumpersulfat	doppelt dest. Wasser

Die *Pufferstamm-lsg.* enthält 14,4% Glycin und 5,5% Tris-hydroxymethylaminomethan, der pH-Wert wird auf 8,6 eingestellt. Die Stamm-lsg. wird zum Ansetzen der Lösungen E 2 und W 2 in einer Verdünnung von 1:2,5 verwendet und dient in einer Verdünnung von 1:10 gleichzeitig als Puffer für die Elektrophorese-apparatur.

Zum *Polymerisieren* der Gele werden 80 mm lange, kalibrierte Duranglas-Röhrchen benutzt, deren Enden plangeschliffen sind und die in einer Höhe von 35 mm und 75 mm je eine Ringmarke enthalten. Die Röhrchen lassen sich an der Unterseite mit einem

¹⁾ Teil der Dissertationen.

²⁾ Zu beziehen durch Fa. E. Barth, Ilvesheim.

Stück Parafilm[®]) dicht abschließen. Das gewährleistet eine völlig glatte untere Fläche der auspolymerisierten Gele. Das Gemisch für die untere, engporige Gelsäule besteht aus gleichen Teilen der Lösungen E 1, E 2, EW 3 und EW 4. Es wird bis zur 35 mm Ringmarke blasenfrei eingefüllt und vorsichtig mit doppelt destilliertem Wasser überschichtet. Nach 30 Min. ist die untere Säule polymerisiert. Das Wasser wird abgeschüttelt und die Oberfläche mit dem Gemisch des weitporigen Gels aus gleichen Teilen W 1, W 2, EW 3 und EW 4 abgespült. Anschließend wird die Lösung bis zur Marke bei 75 mm aufgefüllt und sorgfältig mit Wasser abgedeckt; nach 60 Min. ist die Polymerisation beendet.

Vor dem Auftragen des Serums muß die Oberfläche der Gele mit Elektrophorese-Puffer abgespült werden. Damit wird verhindert, daß ein Teil des aufgetragenen Serum-Eiweiß präzipitiert. Nach Einsetzen der Röhrchen in die Elektrophoresekammer wird der Puffer eingefüllt und das Serum sehr sorgfältig auf die Oberfläche des Gels aufgebracht, z. B. mit Marburg-Pipetten der Firma Netheler & Hinz, Hamburg. Die Elektrophoresen wurden durchgeführt in einem nach unseren Angaben konstruierten Gerät²⁾. Die obere Pufferkammer hält dabei die Spezialröhrchen sowohl bei der Polymerisation als auch bei der Trennung unverrückbar zentriert. Dadurch wird verhindert, daß die Banden schief laufen und die quantitative Auswertung verschlechtern. Bei der späteren Anfärbung mit Amidoschwarz 10B trägt man 5 µl Serum auf, bei Verwendung von Procion-Brilliantblau 10 µl. Die Feldstärke wird auf 10 V/cm gehalten. Die Trennung erfolgt bei konstanter Spannung. Sie dauert insgesamt etwa 3,5 Stdn. Der Puffer in der oberen Elektrophoresekammer wird mit 0,1 ml einer 1proz., äthanolischen Bromphenolblau-Lösung/1 Puffer versetzt. Der Farbstoff wandert mit der Albuminbande. Man bricht die Elektrophorese ab, wenn die Albuminbande 1 cm vom unteren Ende entfernt ist und entfernt die Gele sofort in der üblichen Weise.

Die Gele werden zur Anfärbung zunächst 15 Min. in 20proz. Sulfosalicylsäure fixiert und dann zweimal 15 Min. in dest. Wasser ausgewaschen. Die Färbung geschieht durch 10 Min. Einlegen der Gele in eine 2proz. Lösung von Amidoschwarz 10B in 7proz. Essigsäure oder zweistündiges Einlegen in eine 2proz. Lösung von Procion-Brilliantblau in 7proz. Essigsäure. Die Farbstoffe müssen chromatographisch einheitlich sein, da sonst wechselnde Anfärbungen der Proteine resultieren (8, 9).

Die abgewaschenen Gele werden zur Querentfärbung in eine 0,8 cm dicke Schicht von 0,6proz. Agar eingebettet (10). Zum Gießen verwendet man flüssigen, blasenfreien Agar bei 50°. Entfärbt wird in 0,01M Ammoniumacetat. Die Entfärbung dauert 2 Stdn. bei einer Spannung von 150 V. Diese neuartige Methode zur Querentfärbung liefert sehr scharfe und gleichmäßige Proteinbanden, die sich quantitativ auswerten lassen. Der Querentfärber ist im Handel erhältlich³⁾. Die gleichfalls schonende Entfärbung durch Auswaschen der Gele in 7proz. Essigsäure erfordert bei zweifachem Wechsel der Waschflüssigkeit etwa 48 Stdn.

Die quantitative Auswertung der Proteinbanden läßt sich photometrisch durchführen. Wir haben dazu ein Photometer Eppendorf mit Pherogrammzusatz bei 546 nm benutzt.

Ergebnisse

Die kontinuierliche Elektrophorese in Polyacrylamid nach der hier beschriebenen Methode führt zu Auftrennungen von Normalseren, wie sie in Abbildung 1 wiedergegeben sind. Zur Bezeichnung der einzelnen Banden wurde im wesentlichen die Einteilung von SCHULZE und HEREMANS (11) übernommen. Da die Laufstrecken der Proteine selbst bei genau eingehaltenen Bedingungen nicht genügend charakteristisch sind, haben wir als unverwechselbare Markierungen in den Pherogrammen (Abb. 2) neben Albumin das Transferrin und das α₂-Makroglobulin benutzt. Diese Banden sind auch in



Abb. 1

Auftrennung von drei Normalseren in der kontinuierlichen Polyacrylamid-Gelelektrophorese. a: Haptoglobin 1.1-Typ; b: Haptoglobin 2.1-Typ; c: Haptoglobin 2.2-Typ. Färbung: Amidoschwarz 10B

allen pathologischen Fällen sicher zu erkennen. Die Charakterisierung der einzelnen Gipfel in den Pherogrammen wurde immunologisch (Abb. 3) und im Fall der Haptoglobine auch durch Beladung mit Hämoglobin und anschließende Reaktion mit Benzidin getroffen (vgl. Abb. 5) (12). Bisher ist es noch nicht gelungen, die biologische Bedeutung aller elektrophoretisch getrennten Anteile von Humanseren eindeutig zu klären.

Beim Vergleich der Elektropherogramme von normalen und pathologischen Seren lassen sich aber viele Gesetzmäßigkeiten erfassen. Um diese Veränderungen annähernd quantitativ auswerten zu können, haben wir die Fehler unserer Methode bestimmt und an einigen hundert Seren von Blutspendern die Normalwerte der wichtigsten Gipfel der Pherogramme errechnet (vgl. Tab. 2).

Tab. 2

Quantitative Auswertung von Proteinfraktionen in Normalseren. Die angegebenen Eiweißmengen beziehen sich auf 10 µl Serum. Angefärbt wurde mit Amidoschwarz unter Standardbedingungen. Zur Berechnung der Absolutwerte haben wir die entsprechende Eichkurve aus Abbildung 4 herangezogen. Die Albuminwerte entstammen Normalseren, die vor der Elektrophorese mit 10proz. Saccharose-lösung 1:50 verdünnt wurden

	n	\bar{x}	s	V	$\pm \frac{t \cdot s}{\sqrt{n}}$
		($\cdot 10^{-6}$ g)	($\cdot 10^{-6}$ g)	(%)	($\cdot 10^{-6}$ g)
Albumin	60*	47830,3	923,38	1,93	233,61
Gc 1—I	120	1665,0	370,32	22,24	66,30
Transferrin	312	2221,0	216,36	9,70	23,80
β-Glykoprotein	312	427,8	95,20	22,20	10,56
α ₂ -Makroglobulin	312	522,6	149,00	28,50	16,50
γ-Globulin gesamt	312	4104,6	1043,90	25,40	115,80
Hp 1—I	33	1599,2	458,00	28,00	160,30
Posttransferrin I	33	114,4	37,20	32,00	13,00
Posttransferrin II	33	630,8	143,30	22,00	50,10
Hp 2—1 a	147	126,4	48,40	38,00	7,80
Hp 2—1 b	147	118,7	28,20	24,00	4,50
Hp 2—1 c	147	73,8	18,80	25,50	3,00
Hp 2—1 d	147	39,8	18,10	47,00	2,90
Hp 2—1 e	147	12,5	9,00	71,00	1,30
Posttransferrin I	147	197,0	50,70	25,50	8,10
Posttransferrin II	147	272,2	65,80	24,00	10,50
Hp 2—2 a	132	143,9	44,10	30,60	7,50
Hp 2—2 b	132	148,3	42,00	28,20	7,10
Hp 2—2 c	132	99,9	27,50	27,50	4,70
Hp 2—2 d	132	66,6	22,40	33,60	3,80
Posttransferrin I	132	85,4	31,10	36,40	5,30
Posttransferrin II	132	363,9	149,10	40,90	25,30

³⁾ Parafilm, Marathon Prod. Neenah, Wisc., USA.

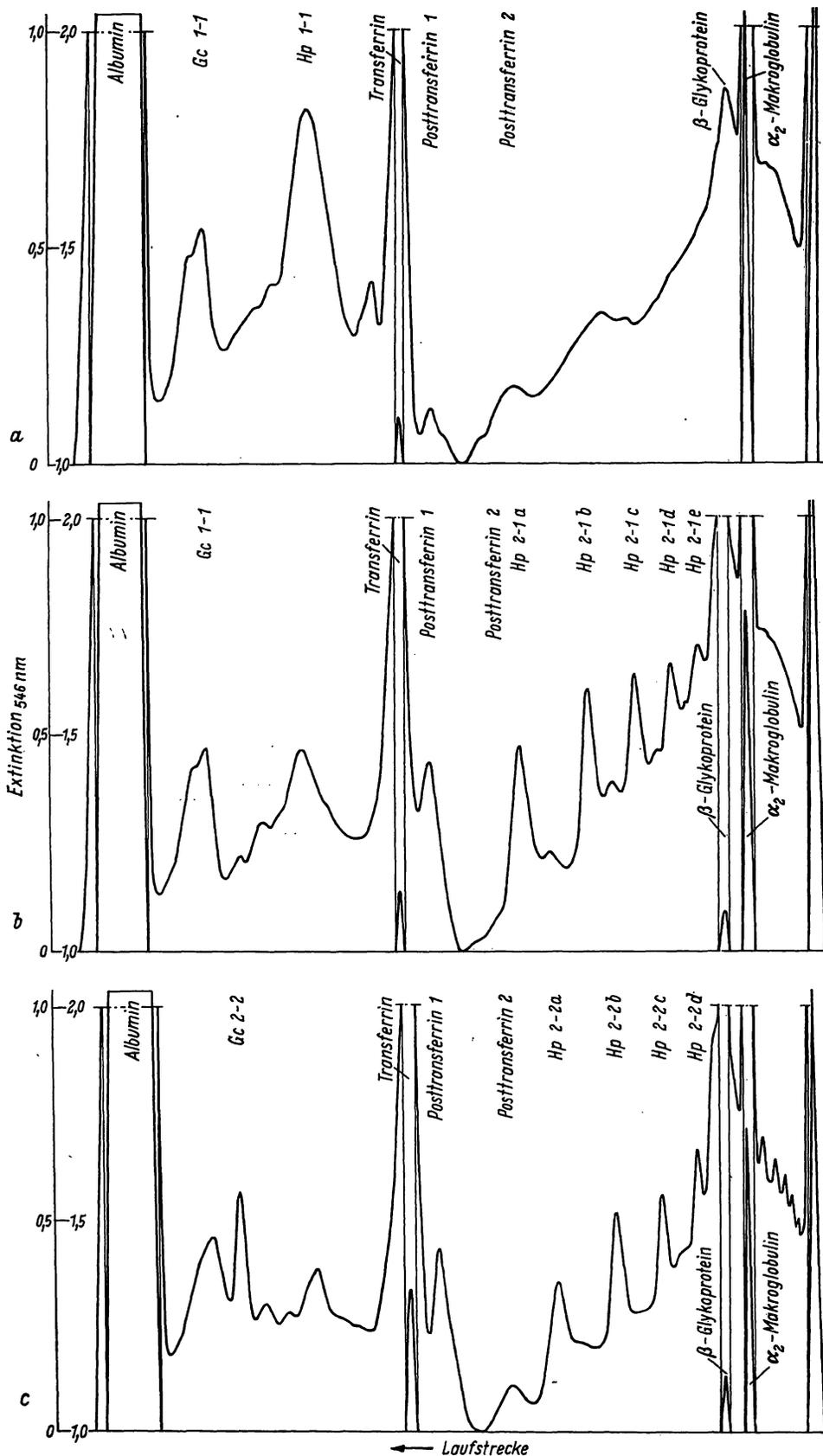


Abb. 2

Pherogramme von drei Normalseren der verschiedenen genetischen Typen.

- a: Hp 1.1, Gc 1.1-Typ;
- b: Hp 2.1, Gc 1.1-Typ;
- c: Hp 2.2, Gc 2.2-Typ.

Ausgewertet wurde in einem Photometer Eppendorf mit Pherogrammzusatz bei 546 nm. Die über eine Extinktion von 1 hinausgehenden Peaks werden durch automatische Bereichsumschaltung zwischen E = 1 und E = 2 registriert

Von der Papier- und Celluloseacetatfolien-Elektrophorese ist bekannt, daß die Bindung der Farbstoffe aus verschiedenen Gründen nicht linear von der zu bestimmenden Eiweißkonzentration abhängt. In dem von uns ausgewerteten Konzentrationsbereich (Extinktion zwischen 0 und 2) zeigte sich in Polyacrylamid eine vollkommene

Linearität für die Bindung von Amidoschwarz 10 B und Procion-Brillantblau. Die Farbstoffintensitäten der Benzidinreaktion bei steigenden Hämoglobinmengen erhöhen sich ebenfalls linear (Abb. 4). Voraussetzung für gleichbleibende Absolutwerte ist die genaue Einhaltung der Färbe- und Entfärbezeiten. Daneben spielt

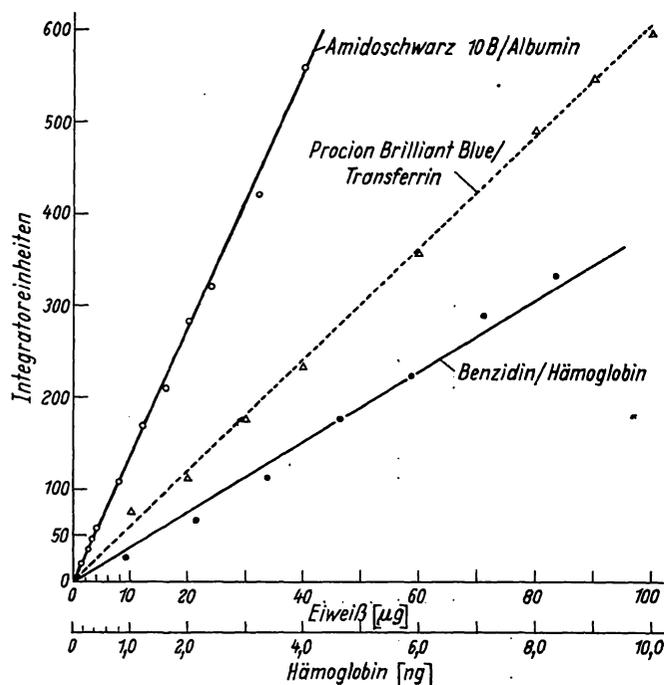


Abb. 4

Abhängigkeit der Farbreaktionen von der Konzentration verschiedener Eiweiße und Farbstoffe. Bedingungen wie unter Material und Methoden angegeben

Tab. 3

Methodische Fehlerbereiche von drei Serumfraktionen desselben Serums. Das Serum wurde unter Normalbedingungen in drei Gruppen einunddreißigmal elektrophoretisch untersucht

	n	\bar{x} ($\cdot 10^{-8}$ g)	s ($\cdot 10^{-8}$ g)	v (%)	$\pm \frac{t \cdot s}{\sqrt{n}}$ ($\cdot 10^{-8}$ g)
Gc 1—1	31	1580,85	79,04	5,00	28,95
Transferrin	31	2353,52	138,38	5,88	50,69
α_2 -Makroglobulin	31	578,89	30,00	5,18	10,99

Wie aus Tabelle 2 und 3 ersichtlich ist, sind die methodischen Fehlerbereiche der drei gemessenen Proteine wesentlich enger als die Normalbereiche der untersuchten Normalseren.

Bei stärkerer Alterung der Seren findet sich eine zunehmende, geringe Denaturierung einiger Fraktionen. Das äußert sich durch unschärfere Pherogrammbanden. Tiefgefrorene Seren (-40°) lassen sich nach mehreren Monaten noch gut auftrennen; mehrfaches Einfrieren und Auftauen führt aber ebenfalls zu Veränderungen einiger Banden (17). Um Auskunft über die Tagesschwankungen einzelner Serumproteine zu erhalten, wurde in mehreren Selbstversuchen in zweistündigem Abstand 24 Stdn. lang Serum abgenommen. Dabei konnten keine über die methodischen Fehlerbereiche hinausgehenden Veränderungen einzelner Proteine entdeckt werden. Eine Ausnahme bildet das α_2 -Makroglobulin, dessen Werte starken Tagesschwankungen unterworfen sind.

Die Zuordnung eines Serums zu einem der drei genetisch bedingten Haptoglobin-Typen ist ohne Schwierigkeiten möglich: Hp 1.1-Seren enthalten eine Bande vor dem Transferrin, Hp 2.1-Seren sind gekennzeichnet durch fünf scharfe Banden zwischen dem Transferrin und dem α_2 -Makroglobulin sowie durch vier zwischen

diesen Hauptbanden liegende, wesentlich schwächere Banden. Die schwachen Zwischenbanden entsprechen den Hauptbanden der 2.2-Typen (Abb. 1 und 2). Die Hp 2.2-Seren enthalten neben 4 ausgeprägten Banden zwischen Transferrin und α_2 -Makroglobulin noch mindestens vier sehr feine, scharfe Banden oberhalb des α_2 -Makroglobulins (Abb. 1). Die Forderung von PARKER und BEARN (18), den 2.2-Typ durch zusätzliche kleinere Banden oberhalb des α_2 -Makroglobulins zu sichern, ist nach der hier beschriebenen Methode überflüssig und ungenauer als die Bestimmung des Typs durch die Wanderungstrecke der 5 bzw. 4 Hauptbanden. Die kleinen Banden sind besonders in pathologischen Seren nicht eindeutig zu identifizieren. Durch Ultrazentrifugation des Serums (8 Stdn. bei 330 000 g) und anschließende Elektrophorese der Sedimentationszonen können zwei weitere unter dem β -Glykoprotein und dem α_2 -Makroglobulin verborgene Haptoglobinpolymere in 2.2-Typ-Seren entdeckt werden.

Bei der Beladung von Haptoglobin mit steigenden Mengen Hämoglobin findet eine erhebliche Lageverschiebung dieser Banden statt, was besonders bei hämolytischen Seren zu beachten ist. Wir haben im Gegensatz zu anderen Autoren (19, 20) durch Vergleich der Proteinfärbung und der Benzidinfärbung bei gleichen Seren festgestellt, daß die Haptoglobinpolymeren des 2.2-Typs und des 2.1-Typs 3 Moleküle Hämoglobin pro Monomermolekül Haptoglobin bei Vollbeladung zu binden vermögen. Zu jedem Haptoglobinpolymer finden sich zwei langsamere Banden mit geringerer Hämoglobinbeladung (bei Hämoglobin-Unterschuß) und eine noch langsamere Bande bei voller Hämoglobinmenge. Das Hp 1.1-Monomere zeigt nur eine Unterbeladungsbande (Abb. 5). Die Anzahl von α -Ketten und β -Ketten der Haptoglobine sowie die Anzahl der gebundenen Hämoglobinmoleküle der einzelnen Polymeren stehen in einem konstanten Verhältnis zueinander. Dies Verhältnis ändert sich in pathologischen Seren (9, 10, 15). Über den molekularen Aufbau der Hp-Polymeren wird getrennt berichtet (21).

Die Haptoglobinpolymeren sowie das α_2 -Makroglobulin sind aufgelagert auf die Immunglobuline G, A und M (vgl. Abb. 3). In dieser heterogenen, wenig aufgetrennten Untergrund-Fraktion lassen sich nur annähernd Einzelkomponenten erkennen. Bei pathologischen Zuständen treten aber gut zuzuordnende Vermehrungen oder Verminderungen der Immunglobuline auf. Besonders eindrucksvoll werden Paraproteine als ein oder mehrere scharfe Gipfel im Bereich der Immunglobuline sichtbar. Diese Gipfel sind leicht auszumachen und gewährleisten nach unserer Erfahrung das sichere Erkennen einer Paraproteinämie.

Der Transferrinbereich besteht in den Pherogrammen aus einem Hauptgipfel und einer geringen Menge einer weniger weitwandernden Komponente. Ein langsamer wandernder Transferrin-Anteil wurde verschiedentlich gefunden (22, 23). Es kann sich dabei aber nicht um ein Transferrin-Dimer handeln, wie vermutet wurde. Ein Dimer müßte eine weitaus stärkere Verzögerung in der

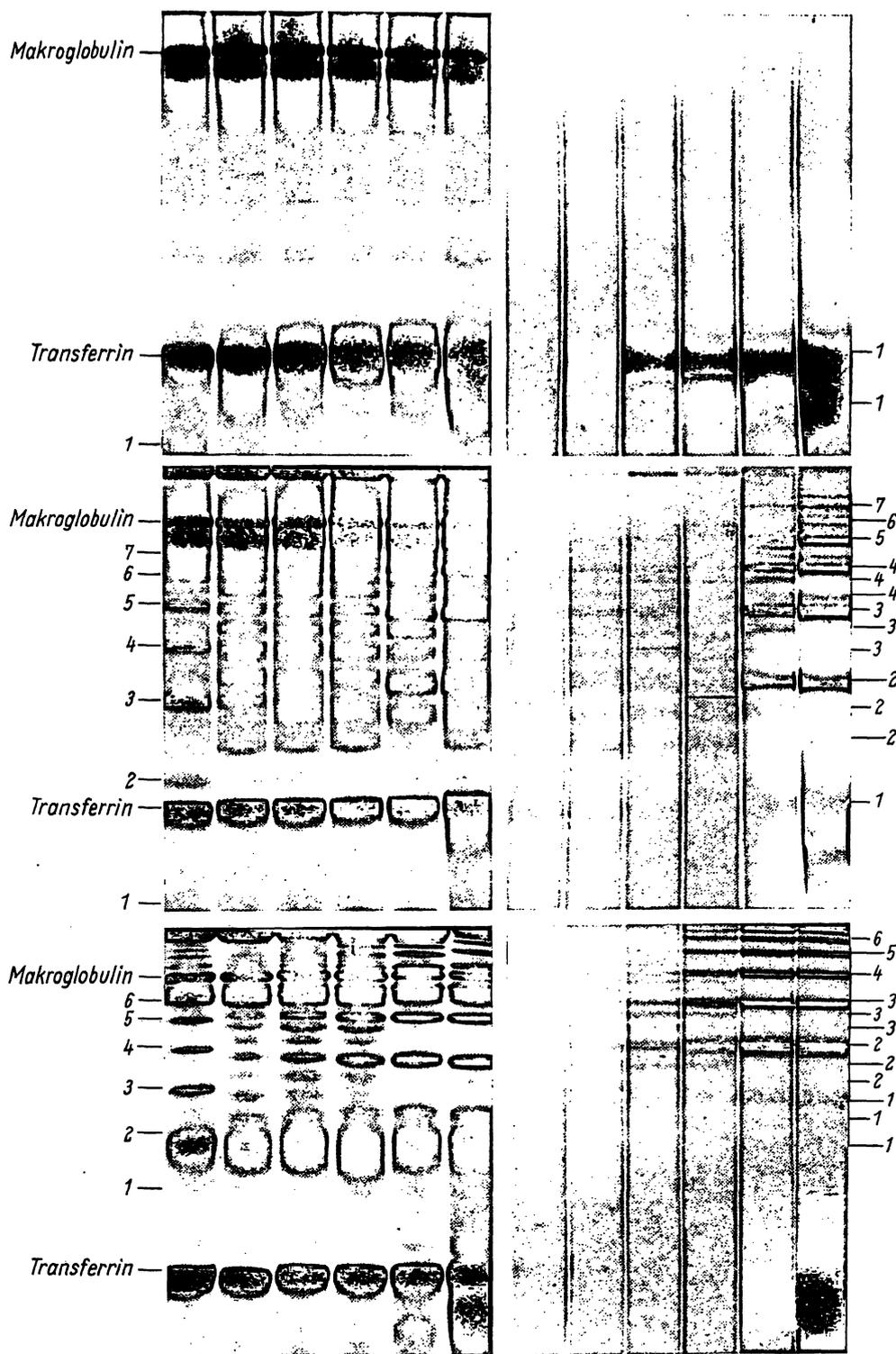


Abb. 5

Beladung von drei Normalseren der drei genetischen Typen mit steigenden Hämoglobinmengen. 10 μ l Serum wurden mit den nachfolgenden Mengen an Hämoglobin 10 Min. lang bei 25° inkubiert und dann elektrophoretisch untersucht. Linke Seite: Amidoschwarzfärbung. Rechte Seite: Benzidin-Reaktion. Die Ziffern zeigen die Lage der unbeladenen, teilbeladenen und vollbeladenen Haptoglobine

Elektrophorese erfahren (21). Interessanterweise besitzt dieses langsame Transferrin eine viel größere Dichte als der Hauptanteil: Die Komponente ist wegen ihrer schnellen Sedimentation bei der Ultrazentrifugation leicht vom Transferrin abzutrennen. Die Pherogramme enthalten im Postalbuminbereich jeweils eine Glycoproteinfraktion Gc. Dieses sog. gruppenspezifische

Protein tritt ebenfalls in genetischen Varianten auf, wobei der in Abbildung 2 dargestellte 1.1-Typ mit einem breiten Doppelgipfel überwiegt. Beim 2.2-Typ zeigt sich dicht neben dem Doppelgipfel eine zweite scharfe, quantitativ stärkere Bande. Seren vom 2.1-Typ enthalten einen breiten Doppelgipfel und an der Stelle des scharfen Hauptgipfels der 2.2-Typen eine kleine, aber

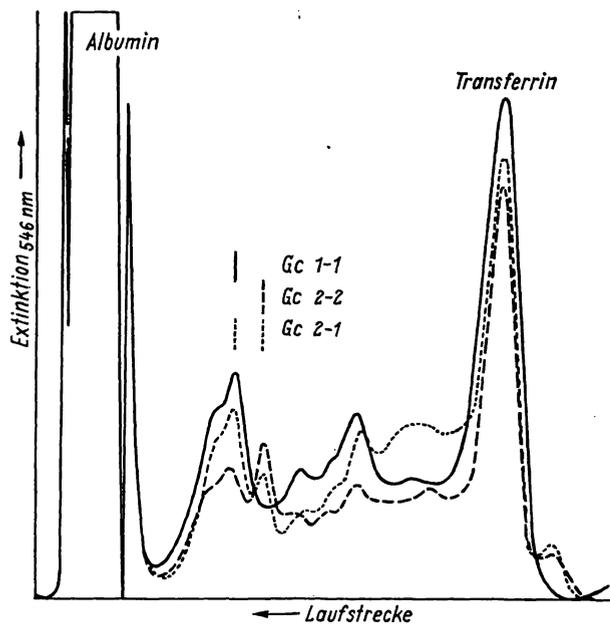


Abb. 6

Vergleichende Darstellung der drei genetischen Gc-Typen im Postalbuminbereich. Ausschnitt aus den Pherogrammen entsprechender Normalseren

gut ausgebildete Bande (Abb. 6). Die Häufigkeit der genetischen Varianten stimmt mit den in der Literatur berichteten überein (11). Die bisher recht schwierige Charakterisierung der Gc-Typen (24) gelingt aus den Pherogrammen ohne Mühe.

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft danken wir für die Förderung dieser Arbeit, Fräulein H. HENZ für wertvolle technische Hilfe.

Literatur

1. ORNSTEIN, L., *Annals N. Y. Acad. Sci.* 121, 321 (1964). — 2. DAVIS, B. J., *Annals N. Y. Acad. Sci.* 121, 404 (1964). — 3. RAYMOND, S. und L. WEINTRAUB, *Science Washington* 130, 711 (1959).
4. MAURER, H. R., *Disk-Elektrophorese*, W. de Gruyter-Verlag Berlin (1968). — 5. RAYMOND, S. und M. NAKAMICHI, *Nature London* 195, 697 (1962). — 6. RAYMOND, S. und M. NAKAMICHI, *Analytic. Biochem.* 7, 225 (1964). — 7. KEUTEL, H. J., *Annals N. Y. Acad. Sci.* 121, 484 (1964). — 8. BUSSE, V. *diese Z.* 6, 273 (1968). — 9. MÜLLER, I., *Dissertation Univ. Hamburg* (1969). — 10. SCHÜTT, K. H., *Dissertation Univ. Hamburg* (1969). — 11. SCHULTZE, H. E. und J. F. HEREMANS, *Molecular Biology of Human Proteins*, Vol. 1, Elsevier Publ. Co, Amsterdam (1966). — 12. CLARKE, J. T., *Annals N. Y. Acad. Sci.* 121, 428 (1964). — 13. PASTEWKA, J. V., A. T. NESS und A. C. PEACOCK, *Clin. Chim. Acta Amsterdam* 74, 219 (1966). — 14. LORENTZ, K., *Dtsch. Arch. klin. Med.* 208, 533 (1963). — 15. ABRAHAM, K., *Dissertation Univ. Hamburg* (1969). — 16. HOFFMEISTER, H., unveröffentlicht. — 17. SCHEIFFARTH, F., H. GÖTZ und R. CERNY, *diese Z.* 3, 81 (1965).
18. PARKER, W. C. und A. G. BEARN, *Amer. J. Human Genetics* 15, 159 (1963). — 19. ZWAAN, J. und T. N. MAKI, *Nature London* 218, 476 (1968). — 20. WINNE, R. J., *Agar Gel Elektrophoresis*, 229 Elsevier Amsterdam (1965). — 21. HOFFMEISTER, H., K. ABRAHAM, I. MÜLLER und K. SCHÜTT, *Kongreßberichte, VII. Intern. Congress of Clinical Chemistry, Genf, Sept. 1969, Enzymol. biol. clin.* 10, 412 (1969). — 22. HARRIS, H., D. G. PENNINGTON, E. B. ROBSON und C. R. SCRIVER, *Ann. Human Genetics* 24, 327 (1960). — 23. PARKER, W. C. und A. G. BEARN, *Science Washington* 137, 854 (1962). — 24. HILGERMANN, R. *diese Z.* 5, 317 (1967).

Doz. Dr. H. Hoffmeister
1 Berlin 33
Bundesgesundheitsamt
Postfach