Entwicklung eines immunochemischen Tests für den Nachweis freier Immunglobulin-Leichtketten (Bence Jones-Proteine) im Urin

Development of an Immunochemical Test for the Detection of Free Immunoglobulin Light Chains (Bence Jones-Proteins) in Urine

K. Peisker^{1,4}, K.-U. Heyer², Katharina Hauser¹, T. Langer³

Zusammenfassung: Mit einer Vielzahl von Optimierungsschritten wurde ein qualitatives immunochemisches Verfahren zum Nachweis freier Immunglobulin-Leichtketten im Urin entwickelt. Das Verfahren beruht auf der Bindung freier Leichtketten an Nitrozellulose-Folie mit anschließender Bindung eines für freie L-Ketten spezifischen Antikörpers vom Schaf oder vom Kaninchen, die nach einem Waschschrift mit einem spezie-spezifischen POD-markierten Antikörper visualisiert wird. Das Verfahren gestattet den Nachweis freier L-Ketten vom Typ Lambda und Kappa mit einer Empfindlichkeit von etwa 20 bzw. 30 mg/l. Für den Nachweis von Bence Jones-Proteinen im Urin ist das Verfahren besser geeignet als Ouchterlony-Technik, radiale Immundiffusion oder Thermo-präzipitation.

Schlüsselwörter: Bence Jones-Protein/Urin; Bence Jones-Protein/Methodik; Proteinurie/Diagnostik; Immunglobuline, kappa-Kette/Urin; Immunglobuline, lambda-Kette/Urin; Immunozyntechniken.

Summary: Through optimizing steps, a qualitative immunochemical procedure has been developed to detect free immunoglobulin light chains in urine. The procedure is based on the binding of free light chains on nitrocellulose membrane with subsequent binding of a light chain-specific antibody from sheep or rabbit. Binding of the antibody is visualized by a second peroxidase-coupled species-specific antibody. The test allows the detection of free light chain lambda and kappa in urine at a concentration of 20 or 30 mg/l, respectively. For the detection of Bence Jones proteins in urine the procedure appears to be better than Ouchterlony technique, radial immunodiffusion or thermoprecipitation.

Keywords: Bence Jones Protein/urine; Bence Jones Protein/methods; Proteinuria/diagnosis; Immunoglobulins, -kappa Chain/urine; Immunoglobulins, lambda Chain/urine; Immunoenzyme Techniques.

Da dem Nachweis freier Immunglobulin-Leichtketten (Bence Jones-Proteine) im Urin eine erhebliche pathognomonische Bedeutung zukommt [1, 2], ist eine zuverlässige Analytik sehr wichtig. Die Unzulänglichkeit beschriebener Nachweisverfahren [3-5] für Paraproteine, speziell für freie leichte Ketten, veranlaßte uns nach einer Möglichkeit zu suchen, auf einfachem und dennoch spezifischem Wege Bence Jones-Proteine im Urin nachzuweisen. Hierzu bieten immunochemische Verfahren die besten Voraussetzungen. Im Hinblick auf die physiologischen Konzentrationen von freien leichten Ketten in der Größenordnung von 10 mg/l [3] sollte der cutoff-Wert des zu entwickelnden Tests bei ca. 20 mg/l liegen. Damit befindet er sich einerseits im sicher positiven Bereich, läßt andererseits aber auch noch geringfügige Erhöhungen erkennen.

Das Prinzip des hier vorgestellten Test läßt sich wie folgt beschreiben:

Die Urinprobe wird auf Nitrozellulose (NC)-Folie aufgetragen. Nach Blockierung der freien Bindungsstellen der NC-Folie kommt das 1. Antiserum (vom Schaf oder Kaninchen) gegen freie L-Ketten zum Einsatz. An eine Waschprozedur schließt sich die Inkubation mit dem 2. Peroxidase (POD)-markierten Antikörper gegen die entsprechende Tierspezies an. Das überschüssige Antiserum wird in einem weiteren Waschschrift entfernt und der gebundene POD-markierte Antikörper als indirektes Maß für vorhandene leichte Ketten durch Inkubation mit POD-Substrat sichtbar gemacht.

Zur Optimierung des Tests waren folgende Versuche erforderlich:

- Austestung verschiedener Trägermaterialien (Hersteller, Porengröße, Konfektionierung)
- Variation der Auftragung des Antigens (Menge, Art),
- Prüfung von Pufferlösungen (Arten, pH-Werte, Konzentrationen),

¹Abteilung für Laboratoriumsdiagnostik,

²Klinik für allgemeine und Visceralchirurgie,

³1. Medizinische Klinik, Nephrologie,

Krankenhaus St. Elisabeth und St. Barbara, Halle

⁴Korrespondenzadresse: Dr. rer. nat. habil. Klaus Peisker, Krankenhaus St. Elisabeth und St. Barbara, Abteilung für Laboratoriumsdiagnostik, Mauerstraße 5, D-06110 Halle (Saale)

Eingegangen: 19. April 1999 / Angenommen: 3. November 1999

- Austestung verschiedener Blockierungsprozeduren (Blockierungsreagenzien, Puffer, Netzmittel),
- Eignungsprüfung von Antisera (Hersteller, Konzentration, Konfektionierung),
- Auswahl von Substratreaktionen zum Nachweis der POD-beladenen Antisera,
- Kontrolle des Verfahrens (Art und Konzentration des Kontroll-Antigens).

Mit dem ausgearbeiteten Testverfahren wurden Untersuchungen an Urinproben von Patienten mit gesichertem Plasmazytom durchgeführt, deren Ergebnisse im Vergleich zu konventionellen Verfahren hier ebenfalls dargestellt werden.

Material und Methoden

Trägermaterialien

Als Trägermaterialien wurden die in Tabelle 1 gezeigten Nitrocellulose (NC)-Folien auf ihre Eignung geprüft.

Tabelle 1 Getestete Trägerfolien	
Hersteller	Porengröße (µm)
Sartorius	0,2 normal
	0,2 mit doppelter Kapazität
	0,45
	1,2
	3,0
	8,0
	8,0 auf Mylar
Schleicher und Schüll	0,1 (BA 79)
	0,2 normal (BA 83)
	0,2 auf Mylar (BA 83)
	0,45 (BA 85)
	0,45 vliesverstärkt (BAS 85)
	5,0 (AE 98)

Die Haftung von Proteinen an den unterschiedlichen Folien, die Ausbildung der Fleckenformen und die Wirksamkeit von Waschschritten läßt sich durch einfache Proteinfärbeverfahren der aufgeblotteten Untersuchungsmaterialien gut differenzieren (Ponceau- und India Ink-Verfahren [6]).

Pufferlösungen

Zur Austestung des Einflusses von Pufferlösungen auf die einzelnen Reaktionsschritte wurden folgende Lösungen auf ihre Eignung geprüft:

1. physiologische Kochsalzlösung
2. physiologische Kochsalzlösung, phosphatgepuffert pH 6,9, (Tablette, Fa. Lorne Laboratories, Twyford, UK)

Nicht standardisierte Abkürzungen: dLC, dimeric light chain; LC, light chain; n, negativ; NC, nitrocellulose; p, positiv; POD, Peroxidase; RID, radiale Immundiffusion; SDS, sodium dodecyl sulfate.

3. Phosphatpuffer (unverdünnt, 1:2, 1:4 verdünnt) [7]
4. Acetatpuffer [7]
5. Phosphat-Zitrat-Puffer [7]
6. Trismaleat-Puffer [7]

Hierbei waren nicht nur ihre Zusammensetzung sondern auch unterschiedliche pH-Werte (pH-Wert: 4, 5, 6, 7, 8, 9) und Konzentrationen der einzelnen Lösungen von Interesse. Die Pufferlösungen wurden für Waschschriffe (zeitlicher Staffelung: 1, 2, 5 und 10 Minuten) Blockierungs- und immunologische Reaktionen eingesetzt. Die Messung der pH-Werte erfolgte am ABL 520 der Fa. Radiometer, Kopenhagen.

Blockierung freier Bindungsstellen auf der NC-Folie, Netzmittel

Die Blockierung der freien Bindungsstellen erfolgte mit Tween 20, Albumin und Magermilchpulver (Milchwerk „Mittelbe“ GmbH, Stendal, D) in unterschiedlichen Konzentrationen (1, 2, 5%) und in verschiedenen Puffern. Die zeitliche Staffelung betrug dabei 5, 10, 15, 30 und 45 Minuten. Durch den Zusatz von oberflächenaktiven Substanzen zu den Reaktionslösungen wird ein Verbesserung der Benetzbarkeit, eine Steigerung der Effektivität von Waschschriffen und evtl. auch die Blockierung freier Bindungsstellen auf der NC-Folie angestrebt. Folgende Netzmittel wurden mit 3 unterschiedlichen Konzentrationen (0,01; 0,02 und 0,05%) in die Testung einbezogen:

1. Tween 20 (SERVA, Heidelberg, D)
2. Triton X 100 (FERAK, Berlin, D)
3. Na-Desoxycholat (Berlin-Chemie, Berlin, D)
4. SDS (SERVA, Heidelberg, D)

Antikörper

Auf der Suche nach optimal geeigneten Antikörpern kamen Antisera folgender Firmen mit den entsprechend ausgewiesenen Verdünnungen in die Prüfung:

Antisera gegen freie leichte Ketten (vom Schaf)

Fa. The Binding Site (Birmingham, UK), Fa. Immuno (Heidelberg, D), Fa. Behring (Frankfurt a. M., D), Fa. Sigma (Deisenhofen, D), Fa. Dako (Hamburg, D), Fa. Sebia (Issy-les-Moulineaux, F) (unverdünnt, 1:2, 1:4, 1:8 u. 1:11).

Antisera gegen das Antigen „Schaf“ (POD-markiert)

Fa. The Binding Site (Birmingham, UK)
Fa. Sigma (Deisenhofen, D)
Fa. Immuno (Heidelberg, D) (1:51, 1:101, 1:201, 1:301, 1:401)

Antiserum gegen freie leichte Ketten (vom Kaninchen)

Fa. Dako (Hamburg, D) (1:2)

Antiserum gegen das Antigen „Kaninchen“ (POD-markiert)

Fa. Dako (Hamburg, D) (1:301)

Die Reaktion sowohl mit dem 1. (gegen die freien leichten Ketten gerichtet) als auch mit dem 2. (POD-

markierten) Antiserum erfolgte in einer zeitlichen Staffelung von 15, 30, 45 und 60 Minuten.

Referenzmaterialien

Als Referenzmaterialien kamen entsprechend deklarierte und von der Matrix harmähnliche Kalibratoren und Kontrollen der Fa. Binding site (RP 016.H, RP 016.E, RP 018.H, RP 018.E, KC 048, KC 039) zur Anwendung. Diese Materialien liefen als Funktionskontrollen (Konzentrationen der freien leichten Ketten etwa 100 und >1 000 mg/l) bei jedem Optimierungsansatz mit.

POD-Reaktion

Die POD-Nachweisreaktion wurde nach *Schrauben* [8] oder *Taketa* [9] durchgeführt, wobei das Reagenz immer frisch anzusetzen war. Die Reaktionen liefen alle unter gemäßigttem Schütteln auf dem Schütteltisch Duomax der Fa. Heidolph (Kehlheim, BRD) ab, wobei für die Streifenfeste Lauer-Plättchen und für die anderen möglichst kleine Reaktionsgefäße verwendet wurden. Spots mit Peroxydaseaktivität erschienen als braunrote Flecken auf relativ hellem Untergrund.

Verfahren zum immunochemischen Nachweis freier leichter Ketten

Als Ergebnis der dargestellten Optimierungsversuche konnte das folgende Verfahren zum immunochemischen Nachweis freier leichter Ketten formuliert werden:

1,0 µl nativen oder konzentrierten Urin auf Nitrocellulose: (Porengröße 0,2 µm der Fa. Sartorius) aufblotzen, trocknen lassen

10 Minuten in einer 5%-igen Magermilchpulversuspension in phosphatgepufferter NaCl-Lösung und unter Zusatz von 0,01% SDS blockieren

30 Minuten Inkubation mit dem 1. Antikörper (anti-Kappa der Fa. The Binding Site, anti-Lambda der Fa. Sebia, 1:2 verdünnt mit Blockierungsreagenz)

2 Minuten im Blockierungsreagenz waschen

30 Minuten Inkubation mit dem 2. Antikörper (anti-Schaf, POD-markiert (The Binding Site oder SIGMA), 1:301 verdünnt mit dem Blockierungsreagenz)

Reaktion in frisch hergestelltem POD-Substrat [8]

2 Minuten waschen mit destilliertem Wasser unter 2-maligem Wechsel des Waschwassers

Visuelles Auswerten im feuchten Zustand.

Untersuchungen an klinischem Untersuchungsmaterial

Bei 10 Urinproben von Patienten mit gesichertem Plasmozytom wurden die Ergebnisse des neuen Tests denen konventioneller Methoden gegenübergestellt. Der Proteingehalt wurde dabei am Vitros 250 (Fa. Johnson & Johnson) gemessen. Die quantitative Bestimmung der Leichtketten erfolgte nephelometrisch am Lasernephelometer (Fa. Dade-Behring). SDS-Elektrophorese und IEF wurden in selbst hergestellten ultradünnen Gelen [10, 11, 12] durchgeführt. Die Urinproteine der Proben, generell auf einen Proteingehalt

von 0,3-0,5 g/l gebracht, ließen sich nach der Elektrophorese gut mit einer Silberfärbung nach *Blum* et al. [13] darstellen. Die Konzentrierung und Entsalzung (wichtig für die IEF in ultradünnen Gelschichten) von Harnproben erfolgte mittels Korbsiebverfahren [12] unter Verwendung des Sephadex G 25 coarse der Fa. Pharmacia (Freiburg, D).

Ergebnisse und Diskussion

Nitrocellulosefolien

Die Versuche mit einer Vielzahl von Folien erlaubten folgende Verallgemeinerungen:

1. Mit zunehmender Porengröße nahm die Bindungsstärke für leichte Ketten ab. Die geringste Porengröße von 0,1 µm zeigte im Vergleich zu den 0,2 µm Varianten ein etwas schlechteres Verhalten bezüglich der Proteinbindung. Auch der Zusatz von Methanol oder Formaldehyd zu den Blockierungsreagenzien trug nicht zur Verbesserung der Haftung bei.
2. Mylar- oder vliesverstärkte NC-Folien zeigten keine Verbesserung der Bindungseigenschaften, oft war die Benetzbarkeit für wäßrige Proben deutlich schlechter und die Auswaschung stärker.
3. Die 0,2 µm Folie mit erhöhter Kapazität wies bei der Probenauftragung eine deutlich schlechtere Benetzbarkeit auf. Die Fleckenausbildung war diffus.
4. Die Folien der Firma Sartorius erwiesen sich für das Testverfahren als besser geeignet als die der Firma Schleicher und Schüll, so daß eine generelle Festlegung auf eine NC-Folie mit 0,2 µm Porengröße der Fa. Sartorius erfolgte.

Pufferlösungen

Von den unterschiedlichen Pufferlösungen zeigte der unverdünnte Phosphatpuffer mit einem pH-Wert von 5,0 die besten Ergebnisse (siehe Abb. 1). Sie unterschieden sich aber nur unwesentlich von denen, die in phosphatgepufferter Kochsalzlösung erreicht wurden. Da sich diese besonders leicht herstellen ließ (Auflösen einer Puffertablette der Fa. Lorne Lab.), wurde diese Lösung für alle weiteren Reaktionen verwendet.

Blockierungsreaktionen

Zur Blockierung erwies sich eine 5%-ige Magermilchpulversuspension am geeignetsten. Eine Zeit von 10 Minuten war für diese Blockierungsreaktionen ausreichend. Da die verschiedenen oberflächenaktiven Substanzen nur unwesentlich unterschiedliche Ergebnisse lieferten (siehe auch Abb. 2), erfolgte eine generelle Festlegung auf SDS in einer Konzentration von 0,01%.

Antiseren

Von den getesteten Antiseren gegen freie leichte Ketten zeigten die der Fa. Binding site (PC 016, PC 018,

Abbildung 1 Abhängigkeit der Reaktionen vom pH-Wert der Phosphatpufferlösung

1 + 2: pH-Wert 5,0 1, 3, 5 und 7: anti-Kappa (PX 016)
3 + 4: pH-Wert 6,0 2, 4, 6 und 8: anti-Lambda (PX 018)
5 + 6: pH-Wert 7,0
7 + 8: pH-Wert 8,0

Konzentration der Kontrollen (je Streifen von oben nach unten)
Kappa 1780 mg/l
Kappa 104 mg/l
Lambda 2020 mg/l
Lambda 162 mg/l

Abbildung 2 Abhängigkeit der Reaktionen von der Art der oberflächenaktiven Substanzen

1 + 2: 0,02% Desoxycholat obere Reihe: anti-Kappa (1, 3, 5, 7 und 9) (PX 016)
3 + 4: 0,02% SDS untere Reihe: anti-Lambda (2, 4, 6, 8 und 10) (PX 018)

5 + 6: 0,02% Triton
7 + 8: 0,02% Tween 20
9 + 10: kein Zusatz

Konzentration der Kontrollen (je Streifen von oben nach unten)
Kappa 1780 mg/l
Kappa 104 mg/l
Lambda 2020 mg/l
Lambda 162 mg/l

PX 016, PX 018) und Sebia die besten Eigenschaften. Sie wiesen einerseits die größte Nachweisempfindlichkeit auf, andererseits waren die Kreuzreaktivitäten gegenüber gebundenen und freien leichten Ketten der jeweils anderen Spezifität (im Gegensatz beispielsweise zu den Antiseren der Fa. Immuno oder Behring) vernachlässigbar [14]. Ihre Aktivität ist so bemessen, daß nur sie in der Ouchterlonytechnik mit den Kontrollen (der Firmen Binding site oder Behring) reagierten. Sie wurden in der Verdünnung 1:2 mit dem Blockierungsreagenz eingesetzt. Die positiven Reaktionen des anti-Kappa-Serums aller Hersteller mit den hohen Konzentrationen der Lambda-Kontrollen (siehe Abb. 1 und 2) konnte nur durch eine Verunreinigung dieser Kontrollen mit Kappa-Anteilen oder durch eine geringe Kreuzreaktivität erklärt werden. Selbst hoch gereinigtes Antigen zur Herstellung der Antiseren ergab solche Befunde, wobei auch hier der Hersteller nicht ausschließen konnte, daß geringe Mengen Kappa enthalten sind.

POD-markiertes anti-Kappa-Serum (von der Fa. Binding site), das den 2. Inkubationsschritt überflüssig macht, zeigte diesen Befund ebenfalls. Die POD-markierten anti-Schaf- und anti-Kaninchen-Seren (z. B. AP 360 von der Fa. The Binding Site) zeigten bei der von der Anfärbung her optimalen Verdünnung von 1:301 keine wesentlichen Unterschiede für die Sera verschiedener Hersteller (siehe auch Abb. 3). Hierbei war das von Schrauwen [8] beschriebene Verfahren wesentlich empfindlicher als die Methode von Taketa [9].

Es ließ sich generell erkennen, daß mit den benutzten Referenzmaterialien (Binding site) die freien Lambda-Ketten deutlich besser als die Kappa-Ketten nachzuweisen sind. Möglicherweise beruhte das auf einer festeren Bindung der Lambda-Ketten, die ja fast vollständig dimerisiert sind (siehe Abb. 4) und der Tatsache, daß größere Moleküle auf Nitrozellulose besser fixiert werden. Aus diesem unterschiedlichen Bindungsverhalten resultierte eine voneinander abweichende Nachweisempfindlichkeit, die in nativen Proben bei den freien Lambda-Ketten bei etwa 20 mg/l und bei Kappa-Ketten bei etwa 30 mg/l lag. Durch Konzentrierung der Urinproben konnte diese Nachweisempfindlichkeit im Bedarfsfalle erheblich erhöht werden.

Anwendung des immunchemischen Streifentests für die Diagnostik

Als Ergebnis der dargestellten Optimierungsversuche wurde das im Teil „Methoden“ dargestellte Verfahren zum immunologischen Nachweis freier leichter Ketten entwickelt, das nach unserer Einschätzung die Analytik von Paraproteinen deutlich verbessert, in Verbindung mit den anderen analytischen Möglichkeiten, wie beispielsweise den verschiedensten Elektrophoreseverfahren [14] und auch der quantitativen Bestimmung von Immunglobulinen und freien leichten Ketten.

Da der Quotient aus der Konzentration freier Kappa- und freier Lambda-Ketten von besonderer Bedeutung

Abbildung 3 Abhängigkeit der POD-Reaktion von der Konzentration des 1. Antikörpers und des POD-markierten 2. Antikörpers sowie vom Trägermaterial

v. l. n. r. - 1. Antikörper: unverdünnt, 1: 10, 1: 100 und 1: 1000 auf jedem Reaktionsfeld

Von oben nach unten: anti-Kappa (PC 016)
anti-Kappa (PX 016)
anti-Lambda (PC 018)
anti-Lambda (PX 018)

obere Reihe (Nr. 1, 3 und 5) 0,2 µm NC-Folie von Sartorius, POD markierter 2. Antikörper 1: 100, 1:200 und 1:400 untere Reihe (Nr. 2, 4 und 6) 0,2 µm Mylar fixiert von Schleicher-Schüll POD-markierter 2. Antikörper 1: 100, 1:200 und 1:400

Abbildung 4 SDS-Elektrophorese von Kontrollen für Bence-Jones-Proteine. Von links nach rechts: 1-6: Kontrollen für leichte Ketten vom Typ Kappa (104; 52; 26; 13; 6,5 und 3,3 mg/l), 7: Proteintestmischung 4 von SERVA mit Carbonic anhydrase = 29 000 Dalton, Eialbumin = 45 000 Dalton, Rinderalbumin = 67 000 Dalton, Phosphorylase B = 97 400 Dalton, 8-13: Kontrollen für leichte Ketten vom Typ Lambda (136; 68; 34; 17; 8,5 und 4,3 mg/l)

für den Nachweis von Bence-Jones-Proteinen ist, sind starke Unterschiede in der Anfärbung der Spots für die Kappa- und Lambda-Ketten als ein deutlicher Hinweis auf eine monoklonale Bildung zu sehen.

Die Tabelle 2 stellt die Ergebnisse von 10 ausgewählten Urinuntersuchungen vor. Es ist gut erkennbar, daß alle Proben, die in der von uns benutzten CAF-Elektrophorese mit einer sensitiven Färbung [Publikation in Vorbereitung] einen Extragradien zeigten, auch in der SDS-Elektrophorese, der IEF, der Neph-

lometrie und dem immunchemischen Test auf NC-Folie freie leichte Ketten oder deren Dimere aufwiesen. Die Probe 9 erbrachte in der Nephelometrie im Gegensatz zu den anderen Methoden unauffällige Ergebnisse, was wahrscheinlich auf die geringe Proteinkonzentration in der nicht angereicherten Probe zurückzuführen ist. Von den 10 Urinproben wiesen 6 monoklonale leichte Ketten auf (Quotient <1,35 oder > 2,65). Bei Urin 6 schienen die freien leichten Ketten polyklonalen Ursprungs zu sein.

Tabelle 2 Analytik bei Urinproben von Plasmozytompatienten.

Lfd. Nr.	Protein (g/l)	Elphor. CAF	Elphor. SDS	IEF	Nephelometrie (mg/l)		Quotient Kappa/Lambda	Immunchemischer Streifentest	
					Kappa	Lambda		Kappa	Lambda
1	0,17	n	LC, dLC	p	8,95	< 4,06	>2,20	p	p
2	0,06	n	LC, dLC	p	88,3	< 4,06	> 21,7	p	n
3	< 0,05	n	-	-	<7,16	< 4,06	-	n	n
4	2,15	Extragrad.	LC, dLC	p	1950	44,6	>43,7	p	p
5	0,15	Extragrad.	LC, dLC	p	127	< 4,06	> 31,3	p	n
6	1,60	n	-	-	127	62,2	2,05	p	p
7	0,69	n	-	-	8,66	20,3	0,42	n	p
8	0,62	Extragrad.	LC, dLC	p	161	< 4,06	> 39,7	p	n
9	0,17	Extragrad.	LC, dLC	p	7,16	< 4,06	-	n	p
10	4,11	Extragrad.	LC, dLC	p	413	26,7	15,5	p	p

Die Nachweis einer klinisch relevanten Bence Jones-Urie ist ein komplizierter Prozeß, und jeder zusätzliche Befund macht die Diagnose sicherer. Der vorgestellte immunchemische Nachweis für die freien leichten Ketten im Urin ist als eine solche Bereicherung der diagnostischen Möglichkeiten anzusehen.

Danksagung

Für die lasernephelometrischen Bestimmungen der Immunglobuline und der freien leichten Ketten sei Frau Dr. *Ingeborg Schneider* aus dem Zentrallabor der Medizinischen Fakultät der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg Dank gesagt. Für die freundliche Überlassung hochgereinigter Antigenpräparationen und POD-markierter Antisera sind wir Herrn Dr. *Wilhelm Herzog* von der Firma The Binding Site zu Dank verpflichtet.

Literatur

1. Kagimoto T, Nakakuma H, Hata H, Hidaka M, Horikawa K, Kawaguti T, Nagakura S, Iwamoto N, Shirono K, Hata K. Differential glycosylation of Bence Jones protein and kidney impairment in patients with plasma cell dyscrasia. *J Lab Clin Med* 1997;129: 217-23.
2. Goranov S. Kappa and lambda light chain proteins - clinical and prognostic significance in patients with multiple myeloma. *Folia Med (Plovdiv)* 1997;39:52-7.
3. Thomas L. Eiweißelektrophorese. München (DE): Urban und Schwarzenberg, 1981.
4. Müller G. Klinisch-chemische Diagnostik. Jena (DE): Gustav Fischer Verlag, 1993.
5. Levinson SS. An algorithmic approach using kappa/lambda ratios to improve the diagnostic accuracy of urine protein electrophoresis and to reduce the volume required for immunoelectrophoresis. *Clin Chim Acta* 1997; 262:121-30.
6. Peisker K. Verbesserte Immunfixationsergebnisse durch den Einsatz eines neuen Färbeverfahrens. *Management & Krankenhaus. Labor Medizin* 1998;5: 47-8.
7. Wissenschaftliche Tabellen Geigy, Teilband Hämatologie und Humangenetik, 8. Auflage. Basel (CH):1979, 60-2.
8. Schrauwen JAM. Nachweis von Enzymen nach elektrophoretischer Trennung an Polyacrylamid-Säulchen. *J Chromatogr* 1966; 23:177-80.
9. Taketa K. A tetrazolium method for peroxidase staining. *Electrophoresis* 1987;9:409-14.
10. Peisker K. SDS-Elektrophorese in ultradünnen Polyacrylamidgelen auf Polyesterfolien, *Z med Lab.-diagn.* 1987;28:38-42.
11. Peisker K. Methodische Untersuchungen zur SDS-Elektrophorese von Harnproteinen, *Z med Labor.-Diagn.* 1984;25:372-7.
12. Peisker K. Die isoelektrische Fokussierung von Harnproteinen in ultradünnen Polyacrylamidgelen, *Z med Lab.-diagn.* 1985;26: 28-32.
13. Blum H, Beier H, Gross HJ. Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. *Electrophoresis* 1987;8:93-9.
14. Hauser K. Nachweis von Paraproteinämien mittels Immunfixation und Ouchterlony-Technik sowie Entwicklung eines Schnelltestes für Bence-Jones Paraproteine. Diplomarbeit am Institut für Mikrobiologie des Fachbereichs Biologie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg. 1996.
15. Marshall T, Williams KM. Electrophoretic analysis of Bence Jones proteinuria. *Electrophoresis* 1999;20:1307-24.