

Über ein Antigen von *Brucella abortus* Bang.

Von

L. Schmid, H. Mielh und Gertrude Zwettler.

Aus dem II. Chemischen Laboratorium der Universität Wien.

Mit 3 Abbildungen.

(Eingelangt am 16. Aug. 1949. Vorgelegt in der Sitzung am 13. Okt. 1949.)

Der Erreger des ansteckenden und seuchenhaften Verwerfens bei Rindern ist der *Bang*-Bacillus, *Brucella abortus Bang* genannt. Eine Schutzimpfung mit abgetöteten Bakterien oder mit Bakterienextrakten ist möglich, doch ist der praktische Wert einer solchen Impfung problematisch.

Im Serum der geimpften Tiere treten in gleicher Weise Abwehrstoffe (Antikörper) auf, wie sie auch im Serum eines kranken Tieres vorhanden sind. Solche Antikörper lassen sich durch serologische Reaktionen erkennen und man verwendet diese Reaktionen auch zum Nachweis der Seuche. Dabei reagieren gesunde Tiere *nach* einer Impfung genau so wie kranke, das heißt sie geben ebensolche Agglutinationstiter.

Bei der Auswertung für diagnostische Zwecke besteht demnach eine gewisse Unsicherheit: Man kann nämlich auf Grund der serologischen Reaktionen allein nicht unterscheiden, ob ein geimpftes Tier später frei von der Infektion geblieben ist oder ob es sich infiziert hat.

Erstrebenswert wäre die Gewinnung eines Impfstoffes, der wohl immunisiert, nicht aber die Bildung von Agglutininen im Organismus bewirkt: von Agglutininen deshalb, weil die Agglutination zur Diagnose der Krankheit verwendet wird. Daß solches bei manchen Bakterien möglich ist, konnte *Boivin*¹ an Bakterien der Salmonellagruppe zeigen. Auch bei den *Bang*-Bakterien schien dies zufolge Beobachtungen *K. Diern-*

¹ *A. Boivin, L. Mesrobeanu und I. Mesrobeanu, C. R. Séances Soc. Biol. Filiales Associées* 114, 307 (1933).

hofers² nicht aussichtslos. *Diernhofer* verwendete als Ausgangsmaterial für seine Versuche einen bei 80° gewonnenen wäßrigen Bakterienauszug, den sogenannten Hitzeextrakt. Auch für die chemischen Untersuchungen, die einer weiteren Bearbeitung vorausgehen mußten, diente dieser Hitzeextrakt aus folgenden Gründen als Ausgangsmaterial: erstens ist er antigen-vollwirksam und zweitens war infolge der Hitzedenaturierung begleitender Eiweißstoffe und deren leichter Abtrennung ein für die Untersuchung geeignetes Material zu erwarten. Der Hitzeextrakt wurde hergestellt durch Erwärmen auf 80° mit Wasser von auf Leberagar gezüchteten, acht Tage alten Bakterien, die vor der Extraktion dreimal mit destilliertem Wasser gewaschen worden waren.

Es war nun das Ziel der chemischen Untersuchung, das Antigen auf seine chemische Einheitlichkeit hin zu prüfen, eventuell vorhandene Komponenten voneinander zu trennen und Einblick in deren Konstitution zu gewinnen. Zur Verfolgung dieser Aufgabe waren zahlreiche qualitative und quantitative Operationen notwendig; diese sollen in einer gesonderten Mitteilung beschrieben werden. Hier sei nur erwähnt, daß man sich aus den Versuchen folgendes Bild vom Antigen herleiten kann: die Aminosäuren Arginin, Histidin, Lysin, Monoaminodicarbonsäuren, wobei es unentschieden ist, ob Asparaginsäure oder Glutaminsäure (oder beide), sowie eine Monoaminomonocarbonsäurefraktion sind peptidartig zu einem Molekül vereinigt. An dieses Peptid ist Muskeladenylsäure gebunden. Die quantitative Zusammensetzung ähnelt weitgehend der eines Nucleohistons. Neben dem Peptid ist als alleiniges Produkt noch ein Glucosepolysaccharid gefunden worden. Über die Art der Bindung des Polysaccharids an das Peptid kann zur Zeit keine abschließende Aussage gemacht werden, obwohl in einem breit angelegten Versuchsmaterial dazu Stellung genommen worden war: nämlich durch chromatographische Analyse, Zerschäumung, Ausschütteln mit Butanol-Chloroform, Dialyse, Extraktion mit Glykolen, Extraktion mit Phenol, Extraktion mit Methanol und Äthanol, Fällung mit Phosphormolybdänsäure, Phosphorwolframsäure, Uranylacetat, Quecksilberacetat, kolloidalem Zinkhydroxyd und anderen. In keinem der genannten Beispiele war es möglich, die Kohlehydratkomponente vom Peptidanteil quantitativ zu trennen. Nebenbei sei bemerkt, daß sich bei den vorerwähnten Versuchen jeweils das Alter der Antigenlösung und auch ihr pH-Wert von Einfluß zeigten. Schließlich, und davon soll im folgenden die Rede sein, wurde die Antigenlösung dem Verfahren der Elektrophorese unterworfen. Es sollte dadurch die Frage entschieden werden, ob das Kohlehydrat und das Peptid als Gemenge nebeneinander vorliegen oder ob eine valenzmäßige Beziehung

² *Schollenberger*, Dissertation Tierärztliche Hochschule, Wien 1939.

zwischen beiden besteht. Endlich sollte dadurch klargestellt werden, ob die nachgewiesene Peptidkomponente einheitlich ist.

Die Elektrophorese wurde in einer mit reversiblen Elektroden ausgerüsteten *Pauli*-Apparatur unter Verwendung der *Svenssonschen* Zylinderlinse³ durchgeführt. Das Spannungsgefälle betrug 4 Volt/cm, die Antigenkonzentration war 0,3%, die Pufferkonzentration 0,1 molar (Citrat-Phosphatpuffer), die Temperatur 20°, die durchschnittliche Versuchsdauer erstreckte sich über 8 Stdn. Nach Beendigung jedes Versuches wurden Proben der verschiedenen Schichten unter Kontrolle der Schlierenbilder mittels Kapillaren⁴ entnommen und zur Analyse gebracht. Zur Bestim-

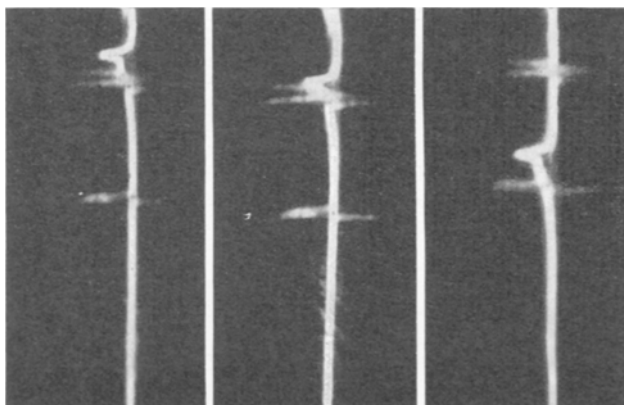


Abb. 1.

Abb. 2.

Abb. 3.

mung des Peptidgehaltes diente die Argininreaktion nach *Sakaguchi*⁵. Zum Nachweis des Kohlehydrats wurden modifizierte *Dische*-Reaktionen⁶ verwendet. Zur Probe auf die Pentose in den Nucleinsäuren diente die Reaktion nach *Bial*.

Bei pH 6 bis 8 konnte weder eine Entmischung von Polypeptid-Polysaccharid, noch eine erkennbare Wanderungsgeschwindigkeit beobachtet werden, da die Versuchsdauer durch störende Diffusionserscheinungen stark begrenzt war. Lediglich die Nucleinsäure wanderte, wie zu erwarten, rasch zur Anode. Anders war die Sache bei pH 4. Zuerst wanderte, wie oben, die Nucleinsäure ab, dann aber erfolgte eine Wanderung des gesamten Komplexes Polysaccharid-Polypeptid zur Anode. Die Wanderungsgeschwindigkeit lag je nach Polysaccharidgehalt größenordnungsmäßig um $2,5 \cdot 10^{-5}$ qcm sec⁻¹ Volt⁻¹.

³ *Svensson*, Kolloid-Z. **90**, 141 (1940).

⁴ *Bennhold*, Kolloid-Z. **62**, 129 (1933).

⁵ *Sakaguchi*, Biochemic. J. **5**, 25; Chem. Zbl. **1925 II**, 1547.

⁶ *Z. Dische*, Mikrochem. **7**, 36 (1929).

Die Abb. 1, 2 und 3 zeigen einzelne Phasen des Verlaufes der Elektrophorese bei pH 4, und zwar Abb. 1 330, Abb. 2 345 und Abb. 3 410 Min. nach Einschalten des Stromes. Wegen der leichten Asymmetrie der Zackenform wurde die Versuchsdauer bis auf 8 Stdn. ausgedehnt. Innerhalb dieser Zeitspanne konnte keinerlei Aufspaltung beobachtet werden. Eine weitere Verlängerung der Versuchsdauer schien im Hinblick auf die Gefahr einer Hydrolyse bei diesem pH nicht ratsam.

Der untersuchte Hitzeextrakt kann demnach als elektrophoretisch einheitlich angesehen werden.