

Über ein Antigen von *Brucella abortus* Bang.

(3. Mitteilung¹.)

Von

L. Schmid, H. Michl und G. Zwettler.

Aus dem II. Chemischen Laboratorium der Universität Wien.

Mit 3 Abbildungen.

(Eingelangt am 21. Febr. 1951. Vorgelegt in der Sitzung am 8. März 1951.)

Als Ausgangsmaterial diente, wie in allen bisherigen Versuchen, wieder der Hitzeextrakt. Seine Überlegenheit gegenüber anderen Darstellungsmethoden eines Antigens ergibt sich aus folgendem:

1. Er ist vollantigen wirksam.
2. Die einzelnen Bausteine werden nicht so weit destruktiv verändert, wie bei einer autolytischen Aufbereitung.
3. Der Hitzeextrakt ist wasserlöslich.
4. Die Darstellung ist ohne komplizierte Methoden verhältnismäßig leicht reproduzierbar.
5. Das Antigen hat keinen Eiweißcharakter mehr, denn durch die Warmwasserbehandlung war das Eiweiß der Zelleiber infolge Koagulation abzutrennen.

Im Hinblick auf die geringe Menge Ausgangsmaterial mußte auch im folgenden — ganz analog wie bei der Untersuchung der Kohlehydrate² — versucht werden, zunächst mit Hilfe von Farbreaktionen möglichst viele Bestandteile zu erkennen. So zeigte

1. die Ninhydrinreaktion einen stark positiven Verlauf.
2. Die *Biuretreaktion* wurde mit Rücksicht auf die Blaufärbung, die die vorhandenen Kohlehydrate mit den Cupriionen in der alkalischen Lösung ergeben, in der von *Pickering* modifizierten Form³ mit Nickel-

¹ 2. Mitt., Mh. Chem. 82, 271 (1951).

² L. Schmid, H. Michl und G. Zwettler, Mh. Chem. 81, 198 (1950).

³ I. W. Pickering, J. physiol. Chem. 14, 354 (1893). — H. Schiff, Liebigs Ann. Chem. 299, 261 (1898).

salzen durchgeführt. Ihr eindeutig positiver Verlauf ließ an dem Vorhandensein von Peptidbindungen keinen Zweifel.

3. Reaktion nach *Sakaguchi*⁴: Mit ihrer Hilfe wurde Arginin qualitativ nachgewiesen und quantitativ bestimmt. Zum Zwecke der quantitativen Auswertung wurde das gesamte sichtbare Spektrum ausgemessen — Abb. 1 zeigt dieses für eine Konzentration von 54,3 γ /ml Antigen — und mit reinem Arginin als Testsubstanz verglichen. Bemerkte sei noch, daß

durch gesonderte Versuche nachgewiesen wurde, daß Pentosen, Hexosen und Purinbasen, besonders Adenin auch bei 10fachem Überschuß die Reaktion nicht stören. Für die quantitative Auswertung ist ferner die Verwendung einer definierten Hypobromitlösung wesentlich; manche in der Literatur anzutreffenden Unstimmigkeiten sind sicher zum Teil darauf zurückzuführen, daß dem Alter der verwendeten Hypobromitlösung zu wenig Beachtung geschenkt wurde.

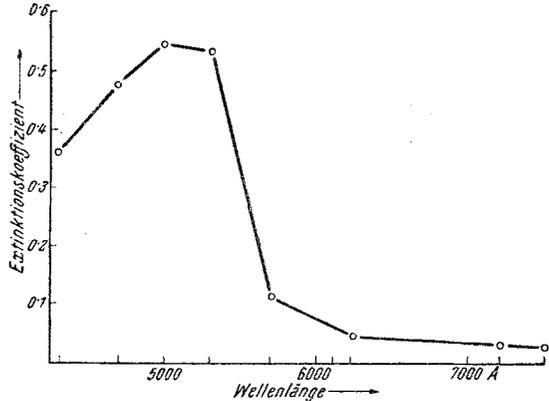


Abb. 1.

verwendeten Hypobromitlösung zu wenig Beachtung geschenkt wurde.

4. *Histidin* wurde durch die Reaktion nach *Kapeller* und *Adler*⁵ eindeutig erkannt. Für die quantitative Bestimmung diente aber die empfindlichere Reaktion nach *Hanke* und *Köfler*⁶. Daß die Reaktion nicht auch durch ev. vorhandenes Tyrosin beeinflusst worden war, ließ sich durch die Reaktion nach *Totani*⁷ ausschließen.

5. Auf *Tryptophan* wurde nach *Adamkiewitsch-Hopkins*⁸, *Fürth*⁹ und *Rosenthaler*¹⁰ geprüft. Die Reaktion fiel so schwach positiv aus, daß die Existenz von Tryptophan als Antigenbaustein angezweifelt werden muß. Auch andere Gründe — siehe weiter unten — machen es wahrscheinlich,

⁴ *S. Sakaguchi*, J. Biochemistry Japan 5, 25 (1925). — *L. E. Thomas*, *J. K. Ingalls* und *J. M. Luck*, J. biol. Chemistry 129, 263 (1939).

⁵ *R. Kapeller-Adler*, Biochem. Z. 264, 131 (1933).

⁶ *M. T. Hanke* und *K. K. Koessler*, J. biol. Chemistry 39, 497 (1919); 43, 521 (1920).

⁷ *G. Totani*, Biochemic. J. 9, 385 (1915).

⁸ *A. Adamkiewicz* und *F. G. Hopkins*, mod. nach *H. Fasal*, Biochem. Z. 44, 392 (1912).

⁹ *O. Fürth* und Mitarbeiter, Biochem. Z. 109, 103, 124 (1920).

¹⁰ *L. Rosenthaler*, Apoth.-Ztg. 22, 678; Chem. Zbl. 1907 II, 946.

daß man es mit geringen Verunreinigungen zu tun hatte, auf die die so empfindlichen Tryptophanreaktionen ansprechen.

Im Zusammenhang mit den Tryptophanproben sei auf den Befund von *Pennel* und *Huddleson*¹¹ hingewiesen, die für ihr Bang-antigen einen Tryptophangehalt von 9,47% angeben. Diese Werte wurden nach der Methode von *Gortner* und *Holm*¹² erhalten, die den unter bestimmten Bedingungen erhaltenen Huminstickstoff als Tryptophanstickstoff in Rechnung stellt. Diese Methode scheint jedoch bei Brucellenantigenen nicht statthaft, da wegen der Anwesenheit von Kohlehydraten die Hexonbasen und die Purine an der Huminbildung beteiligt sind. Mög-

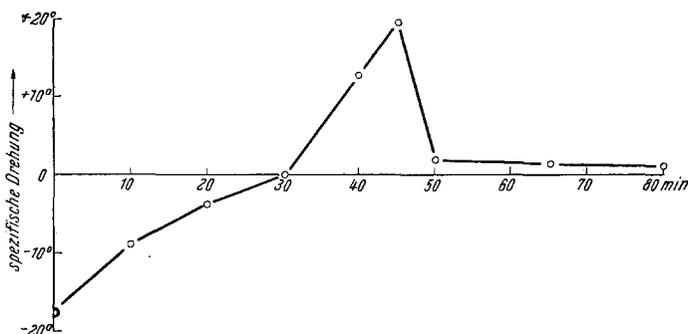


Abb. 2.

licherweise ist der letztere Umstand der Grund für die Beobachtung von *Pennel* und *Huddleson*. Daß auch in deren Antigen weit weniger Tryptophan vorhanden sein mußte, als sie aus dem Huminstickstoffgehalt schlossen, beweist der schwache Ausfall der Reaktion nach *Rosenthaler*, wie ihn obige Autoren beschreiben.

6. *Cystin* oder ein anderer schwefelhaltiger Baustein konnte nicht enthalten sein, da das Antigen keinen Schwefel enthält.

7. Farbreaktionen auf Kreatin, Kreatinin¹³, Oxyprolin¹⁴ und Tyrosin¹⁵ waren durchwegs negativ.

Mehr war durch Anwendung von Farbreaktionen allein nicht zu ermitteln.

¹¹ R. P. Pennel und F. I. Huddleson, Techn. Bull. 156 of agricultural station (1938).

¹² R. A. Gortner und G. E. Holm, J. Amer. chem. Soc. **39**, 2494 (1917).

¹³ Th. Weyl nach E. Salkowski, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. **9**, 127 (1884).

¹⁴ K. Lang, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. **219**, 148 (1933). — E. Waldschmidt-Leitz und S. Akabori, ebenda **224**, 187 (1934).

¹⁵ G. Denigés, C. R. Acad. Sci. Paris **130**, 583 (1900). — H. Pauly, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. **94**, 284 (1915).

Eine Möglichkeit, weiterzukommen, bestand darin, das Antigen zu hydrolysieren und im Hydrolysat durch Fällungsreaktionen Identifizierungen zu erreichen. Im Zusammenhang damit tauchte die Frage nach den günstigsten Hydrolysebedingungen auf. Das Antigen mußte ja einerseits vollständig durchhydrolysiert werden, andererseits durfte man mit Rücksicht auf die Purine und die Huminbildung keine zu energischen Bedingungen anwenden.

Der Hydrolysenverlauf wurde durch Bestimmung des Humin- und Puringehaltes verfolgt. Ferner wurde der Verlauf der spezifischen Drehung mit fortschreitender Hydrolyse beobachtet, wie Abb. 2 für 4gewichts-%ige Schwefelsäure zeigt.

Die Kurve läßt erkennen, daß bereits nach 50 Min. Hydrolysendauer eine annähernde Konstanz der Drehung erreicht ist. Auffällig ist der steile Abfall vom Maximum, für den keine Deutung gegeben werden soll.

Die Zerlegung der Hydrolysate in Einzelfractionen erfolgte in Anlehnung an den von *Kossel*¹⁶ angegebenen Gang, allerdings mit der Einschränkung, daß bei unseren Versuchen nur mit $\frac{1}{10}$ bis $\frac{1}{100}$ der von *Kossel* verwendeten Einwaagen das Auslangen gefunden wurde. Ferner mußte auf das Vorhandensein von Purinen entsprechend Rücksicht genommen werden. Zur Entscheidung der Frage, ob die *Kosselsche* Methode auch unter den erwähnten Bedingungen angewendet werden darf, mußten gesonderte Versuche ausgeführt werden. Vergleichsstudien an Hefenucleinsäure und Casein ließen keinen Zweifel darüber, daß die Methode auch für so kleine Substanzmengen geeignet ist.

Nach ihr konnten also bei pH 3 die Purinbasen mit Silbersulfat abgetrennt werden. In dieser Fraktion war nur *Adenin* und *Hypoxanthin* enthalten.

Im Filtrat der Purine wurde mit Silbersulfat bei pH 7 die sogenannte *Histidinfraktion* abgeschieden; in dieser konnte Histidin, Monoaminocarbonsäuren sowie Pyrimidine enthalten sein. Auf letztere wurde besonders sorgfältig geprüft, ohne daß solche nachgewiesen werden konnten. Nur Histidin und eine Monoaminocarbonsäurefraktion war vorhanden. Letztere konnte zunächst nicht näher identifiziert werden.

Aus dem Filtrat der Histidinfraktion wurde die Argininfraktion bei pH 10 mit Silberoxyd abgeschieden. In dieser Fraktion konnte man mit dem Vorhandensein von Arginin, Guanidin und Methylguanidin rechnen. Sie bestand jedoch ausschließlich aus Arginin, wie durch den quantitativen Vergleich der kolorimetrisch nach *Sakaguchi* und der nach *Kjeldahl* ermittelten Stickstoffwerte bestätigt wurde.

Die verbleibende Mutterlauge wurde mit Schwefelsäure angesäuert

¹⁶ *A. Kossel*, Protamine und Histone. Leipzig und Wien. 1929. — *F. Hoppe-Seyler* und *H. Thierfelder*, Physiologische und pathologisch-chemische Analyse, S. 868. Berlin. 1924.

und aus ihr mit Phosphorwolframsäure die *Lysinfraktion* abgeschieden. In ihr war mit der Anwesenheit von Lysin, Putrescin, Cadaverin zu rechnen. Als alleiniger Bestandteil lag nur das Lysin vor. Es wurde als Pikrat zur Kristallisation gebracht und als solches identifiziert.

Die *Monoaminomonocarbonsäurefraktion*, die sich im Filtrat der Lysinfraktion befindet, wurde nicht näher untersucht.

Mit Hilfe des beschriebenen Trennungsganges waren also folgende Verbindungen erkannt worden: Adenin und Hypoxanthin (vgl. II. Mitt.¹), Arginin, Histidin, Lysin und eine Monoaminodicarbonsäurefraktion.

Diese durch Farb- und Fällungsreaktionen erarbeiteten Befunde ließen sich durch Papierchromatogramme überzeugend bestätigen und für die

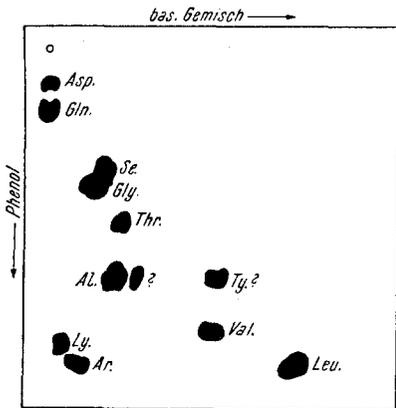


Abb. 3. Ar. = Arginin, Asp. = Asparaginsäure, Al. = Alanin, Gly. = Glycin, Gln. = Glutaminsäure, Leu. = Leuzin, Lys. = Lysin, Se. = Serin, Thr. = Threonin, Ty. = Tyrosin, Val. = Valin.

überzeugend bestätigen und für die Monoaminomon- und dicarbonsäurefraktion sogar noch erweitern. Zu diesem Zweck wurde energisch hydrolysiert, so daß der Großteil der Zucker- und Purinkörper zerstört wurde; ein Verfahren, das sich für die papierchromatographische Trennung günstiger als mildere Hydrolyse mit nachfolgender Entfernung der Zucker erwies¹⁷. Während eindimensionale Chromatogramme das Vorhandensein von Histidin und Arginin bestätigten, gewährte das zweidimensionale einen Überblick über die gesamten Aminosäuren des Antigens.

Doch ist damit zu rechnen, daß durch die energische Hydrolyse Aminosäuren auch aus den Purinen entstanden sein können (besonders Monoaminomonocarbonsäuren).

Es wurden die folgenden Aminosäuren gefunden (siehe Abb. 3):

Arginin, Lysin, Histidin, Glutaminsäure, Asparaginsäure, Serin, Glycin, Threonin, Alanin, Tyrosin (?), Valin, Leucin.

Schwefelhaltige Aminosäuren wurden erwartungsgemäß nicht gefunden. Die Ursache des Fleckes neben dem Alanin wurde nicht näher untersucht. Bemerkenswert ist ferner noch das Fehlen von Prolin und Oxyprolin. Histidin ist im zweidimensionalen Chromatogramm nicht sichtbar.

Das nächste Ziel war eine möglichst quantitative Erfassung der Komponenten. Durch den geringen Substanzvorrat wurde diese Aufgabe erschwert. Im Prinzip wurde die Methode der Stickstoffverteilung nach

¹⁷ E. Kofrányi, Naturwiss. 37, 91 (1950).

Hausmann, van Slyke und *Kossel-Kutscher*¹⁶ zum Vorbild genommen, allerdings mit der wesentlichen Einschränkung eines knappen, etwa $\frac{1}{100}$ der obigen Ansätze betragenden Materialeinsatzes. Das quantitative Ergebnis läßt sich kurz dahingehend zusammenfassen (Gesamt-N gleich 100%):

Humin-N 15,3%, Purin-N 32,5%, Arginin-N 8,1%, Histidin-N 6,1%, Lysin-N 12,6%, Monoaminodicarbonsäure-N 14%, Monoaminomonocarbonsäure-N 13%.

Zur Kritik dieser Werte sei folgendes gesagt:

Argininwert: Bei kurzen Verseifungszeiten von 70 Min. mit 4%iger Schwefelsäure stimmten der aus der Stickstoffverteilung¹⁶ ermittelte Wert mit dem nach *Sakaguchi* am unverseiften Produkt erhaltenen gut überein. Bei längerer Hydrolyse (z. B. 10 Stdn.) oder Verwendung stärkerer Säuren (10%ige Schwefelsäure) sinkt der Argininwert von 8,2 auf 6,1% ab.

Histidinwert: Auch beim Histidinwert war gute Übereinstimmung zwischen den obigen und den nach *Hanke* und *Köfler*⁵ durchgeführten kolorimetrischen Bestimmungen festzustellen.

Lysinwert: Dieser konnte nur aus der Stickstoffverteilung ermittelt werden.

Vergleicht man nun das molare Verhältnis, in welchem die Hexonbasen am Antigenaufbau beteiligt sind, so war aus obigen Analysen und solchen anderer Fraktionen immer wieder das gleiche Verhältnis Arginin : Histidin : Lysin 1 : 1 : 3 zu finden gewesen.

Zur Frage der Bildung des *Huminstickstoffes* muß etwas weiter ausgeholt werden. Der *Huminstickstoff* stieg ganz allgemein mit Verschärfung der Hydrolysenbedingungen. Im folgenden wird auf die Möglichkeit hingewiesen, den Anteil stickstoffhaltiger Bestandteile zahlenmäßig zu verfolgen. Das Prinzip liegt im folgenden: Gelingt es, in einem Produkt den Gehalt an einer einzelnen Komponente z. B. durch eine Farbreaktion vor der Hydrolyse festzustellen und mit seinem Wert nach der Hydrolyse zu vergleichen, so kann die Differenz ein Maß für die Bildung des *Huminstickstoffes* sein. Soweit man die Verhältnisse am Antigen bisher überblicken kann, kommen als Huminbildner besonders das Adenin und die Hexonbasen in Betracht. Glücklicherweise gestattet die kolorimetrische Bestimmung nach *Sakaguchi*, den Verlauf der Argininabnahme mit der Dauer der Säureeinwirkung zu verfolgen. Folgende Tabelle gibt darüber Auskunft:

Zeit der Hydrolyse mit 5%iger Schwefelsäure bei 100° C.	0 Stdn.	6 Stdn.	8 Stdn.	16 Stdn.
Arginin nach <i>Sakaguchi</i> , Extinktion bei 5000 A	0,342	0,209	0,183	0,067

Zur Ermittlung des Anteiles *Purinstickstoff* am *Huminstickstoff* wurde der Puringehalt nach Verseifung unter möglichst schonenden Be-

dingungen ermittelt und dieser Wert in Vergleich gesetzt mit einem solchen, der nach einer energischen Hydrolyse bestimmt worden war. Im ersteren Fall ergab sich 40%, im letzteren 32,5%. Man sieht also, daß die Purine je nach den Hydrolysenbedingungen ganz enorm an der Huminbildung beteiligt sein können. Würde man den Purinstickstoff als Adenin aus dem Gehalt an Ribosephosphorsäure¹ (7,2 bis 4%) berechnen, ergäbe sich sogar ein noch höherer Gehalt von 44% Adeninstickstoff. Berücksichtigt man also nun den Anteil des Huminstickstoffes auf Grund der vorstehenden Überlegungen, so kommt man zu folgender Verteilung:

Purin-N 44%, Arginin-N 8,1%, Histidin-N 6,1%, Lysin-N 12,6%, Monoaminodicarbonsäure-N 14%, Monoaminomonocarbonsäure-N 13%.

Die Summe der erhaltenen Zahlen ergibt beinahe 100%; der Schluß ist also berechtigt, daß keine nennenswerten stickstoffhaltigen Komponenten übersehen worden sind, die noch am Antigenaufbau beteiligt sein könnten.

Die qualitative und quantitative Untersuchung der stickstoffhaltigen Bausteine hat damit einen gewissen Abschluß erreicht. Darüber hinaus wurde aber versucht, die durch Farbreaktionen und im Gange der Stickstoffverteilung nachgewiesenen Antigenbausteine möglichst auch in Substanz zu isolieren. Die Darstellung erfolgte in enger Anlehnung an den oben skizzierten Gang. An Purinbasen waren danach Adenin in Form des Pikrates und das Hypoxanthin in der Form eines Silberpikrates isolierbar. Zersetzungspunkt und Stickstoffgehalt waren in guter Übereinstimmung mit den erwarteten Werten. Histidin wurde in solcher Menge angereichert, daß es aus Wasser umkristallisiert werden konnte: Zersp. 279 bis 280°. Arginin wurde als Flavianat gefällt und nach Zerlegung desselben als Pikrat abgeschieden: Zersp. 205°. Lysin isolierte man als Pikrat vom Zersp. 250°.

Mit Hilfe der Stickstoffverteilung und biologischer Reaktionen wurde nun versucht, weitere Aufschlüsse über die Einheitlichkeit und den Aufbau des „Antigensymplexes“¹ zu erhalten. Dieser besteht einerseits aus den stickstoffhaltigen Bausteinen, die man zufolge ihrer Zusammensetzung, Löslichkeits- und anderer Eigenschaften, z. B. mangelnder Hitzedenaturierbarkeit, als nucleinsaures Salz eines Polypeptides ansehen kann. Andererseits ist, wie in der 2. Mitt.¹ gezeigt wurde, ein ansehnlicher Kohlehydratanteil am Antigenaufbau beteiligt. Durch Fällungsreaktionen kann man das elektrophoretisch einheitliche Material in ein Polysaccharid und in den stickstoffhaltigen Anteil mit dem Rest der Kohlehydrate spalten. Die serologische Prüfung beider Fraktionen zeigte, daß lediglich der stickstoffhaltigen Fraktion eine präzipitierende, bzw. agglutinationshemmende Wirkung zukam; das Polysaccharid erwies sich als inaktiv. Die biologische Wirksamkeit der stickstoffhaltigen Fraktion hatte sich im Verhältnis zum ursprünglichen Antigen im gleichen

Maße vermehrt, wie ihr Stickstoffgehalt. Dieser erreichte bei 6,0% sein Maximum. Eine *weitere* Anreicherung der biologisch wirksamen, bzw. stickstoffhaltigen Substanz durch fraktioniertes Umfällen mit Alkohol oder Adsorbieren, z. B. an kolloidales Zinkhydroxyd, trat nicht ein und führte — siehe unten — höchstens zu denaturierten Produkten.

Diese Befunde wurden durch Bestimmung der Stickstoffverteilung der erhaltenen Fraktionen ergänzt. Diese zeigt — wie sich aus der Tabelle erkennen läßt — bei den einzelnen Fällungen eine deutliche Konstanz, soweit dies bei so schwierigen Analysenmethoden (Huminbildung bei der Verseifung, Bestimmung von etwa 1 mg Stickstoff, der sich auf 5 Fraktionen verteilt usw.) überhaupt möglich ist.

Fällung mit	50%igem	90%igem	Bleiazetat	Zinkhydroxyd
	Alkohol			
Purin-N	32,4%	35,1%	34,5%	32,2%
Hexonbasen-N	25,2%	23,3%	21,1%	22,9%
Monoaminodikarbonsäure-N . . .	11,0%	10,0%	} 24,0%	13,7%
Monoaminomonokarbonsäure-N	13,0%	13,0%		13,7%
Humin-N	14,3%	15,1%	21,0%	19,8%

Sowohl die Konstanz der biologischen Wirksamkeit und des Gesamtstickstoffgehaltes bei Fällungsreaktionen, als auch die Konstanz der Stickstoffverteilung sprechen für die *Einheitlichkeit der stickstoffhaltigen Komponente*.

Ein Phänomen sei noch besonders hervorgehoben, nämlich das der Alterung. Ganz allgemein war bei den Metallsalz-fällungen in bezug auf die Vollständigkeit der Fällungen ein recht widerspruchsvoll erscheinendes Verhalten festzustellen. So war z. B. bei Verwendung einer ganz frisch bereiteten Antigenlösung mit Fällungsmitteln nur eine Trübung und keine Niederschlagsbildung zu beobachten. Lösungen, die vor dem Ausfällen einige Stunden gestanden waren, ergaben sofort Fällungen. Dieses Verhalten war der Anlaß, die Fällbarkeit in Abhängigkeit vom Alter der verwendeten Antigenlösung zu untersuchen. So zeigt folgende Tabelle die Fällbarkeit des Antigens durch Uranyl- bzw. Bleiacetatlösung in Abhängigkeit von der Zeit.

Bleiazetatfällung.

Alter der Antigenlösung . . .	6 Stdn.	8 Stdn.	12 Stdn.	24 Stdn.	5 Tage
Vom Gesamt-N werden gefällt	37%	55%	67%	66%	76%
Vom Gesamtarginin werden gefällt	40%	56%		70%	73%

Uranylacetatfällung.

Vom Gesamt-N werden ge- fällt	29%	65%	63%
Vom Gesamtarginin werden gefällt	31%		60%

Aus diesen Versuchen läßt sich folgern, daß die optimale Fällbarkeit nach etwa 24 Stdn. erreicht ist.

Parallel mit den Alterungsversuchen gingen Viskositätsmessungen der Antigenlösungen. Es zeigte sich, daß mit zunehmendem Alter die Viskosität zunimmt. Nun ist es möglich, aus Viskositätsmessungen gewisse Schlüsse auf die Gestalt des kolloidal gelösten Teilchens zu ziehen. Bei uns lagen nun die Anfangswerte nur bis zu 50% über den nach der *Einsteinschen* Formel¹⁸ errechneten. Es war also keine wesentliche Abweichung von der Kugelgestalt und auch keine erhebliche Solvatation anzunehmen. Nach 48 Stdn. war die Viskosität auf das 8fache dieses Wertes angewachsen:

	0 Stdn.	24 Stdn.	48 Stdn.
Spezifische Viskosität einer 0,56%igen Antigen- lösung	0,0108	0,0320	0,0815

Es ist naheliegend, aus dieser Änderung der Viskositätswerte mit der Zeit auf eine Änderung der Teilchenform zu schließen, etwa im Sinne einer Streckung derselben. Man könnte sich dies etwa so vorstellen, daß die Alterung als eine Art Aufwicklung eines Peptidknäuels zu deuten wäre. Dadurch wird die Oberfläche der Antigenteilchen vergrößert; es kommen mehr polare Gruppen an die Oberfläche und die Fällbarkeit durch Schwermetallsalze wird erhöht.

Im Zusammenhang mit den Fällungsreaktionen sei noch kurz auf folgende bemerkenswerte Feststellung hingewiesen. Immer, wenn das Mengenverhältnis Polysaccharid zu Polypeptid zugunsten des Polypeptides verändert wurde, nahm dessen Löslichkeit ab. Es hatte den Anschein, daß dem Polysaccharid die Rolle eines Schutzkolloides zukomme. In gesonderten Versuchen konnte die Schutzkolloidwirkung dieses Polysaccharides gegenüber Gold- und Silbersolen nachgewiesen werden.

Über die Teilchengröße.

Schon der positive Ausfall der Biuretreaktion zeigte eine untere Grenze des Molekulargewichtes an. Um ein hochmolekulares Eiweiß oder Polysaccharid konnte es sich aber auch nicht handeln, da sonst eine Hitzedenaturierung oder bestimmte Fällungsreaktionen, etwa positive Sulfosalicylsäurereaktion, bzw. eine Farbreaktion mit Jod zu erwarten

¹⁸ Z. B. *B. Jirgensons* und *M. E. Straumanis*, Kolloidchemie, S. 99. Berlin, Göttingen, Heidelberg, 1949.

gewesen wäre. In unserem Fall schien als die geeignetste Methode zur Schätzung der Teilchengröße die Bestimmung des Diffusionskoeffizienten. Damit konnte auch gleichzeitig eine Einheitlichkeitsprüfung verbunden werden. Die Messung erfolgte im wesentlichen nach der Methode von *Oeholm*¹⁹. Die Diffusionsdauer erstreckte sich auf 8 Tage, die Diffusions säule wurde in 5 Schichten zerlegt. Jede Schicht wurde gesondert auf Hexosen, Pentosen, Stickstoff und Arginin untersucht. Aus dem ermittelten Gehalt in den verschiedenen hoch gelegenen Schichten wurde der Diffusionskoeffizient berechnet. Es war nun bemerkenswert, daß die Diffusionskoeffizienten und mittelbar dadurch die Teilchengröße, die sich aus den Pentosen-, Hexosenwerten usw. berechnete, innerhalb der analytischen Fehlergrenze zum gleichen Wert führten. Die errechnete Teilchengröße ist im Durchschnitt 3000. Dieser Wert kann auf alle Fälle nur eine Mindestteilchengröße darstellen; denn die Säurenatur der Substanz bedingt in gleicher Richtung wie die systematischen Fehler der Methode einen zu großen Diffusionskoeffizienten und damit ein zu kleines Molekulargewicht.

Die Diffusionsversuche führen ähnlich wie die Ergebnisse der Elektrophorese zu dem Schluß, daß man es mit einem einheitlichen Untersuchungsmaterial zu tun hat. Dem steht allerdings gegenüber, daß durch Alkohol- bzw. Metallsalzfällungen ein *Teil* des Polysaccharides aus dem Gesamtverband abtrennbar ist. Man sieht also, daß eine, wenn auch lose Bindung vorhanden ist, die zwar nicht durch Wasser zwischen pH 4 und 8 gesprengt wird, wohl aber durch an sich schonende Fällungsmittel, wie Alkohol oder Schwermetallsalze. Über die Art dieser Bindung können zur Zeit keine näheren Aussagen gemacht werden.

Nach Erarbeitung der vorstehenden Versuchsergebnisse war es uns möglich, mittels der Elektrophorese auf Filtrierpapier in der von *H. Michl* entwickelten Versuchsanordnung²⁰ neuerlich zur Frage der Einheitlichkeit des Bang-antigens Stellung zu nehmen. Dabei zeigte es sich, daß die Hauptmenge bei pH 4 zwar nicht wandert, hingegen zwei ninhydrinpositive Komponenten in ganz geringer Menge sich zur Kathode hin bewegen. Es muß betont werden, daß dieser letzte Versuch mit einem einige Jahre alten Präparat ausgeführt werden mußte, da das frisch bereitete Material für die oben beschriebene Arbeit aufgebraucht worden war. Ob also die nachgewiesenen Spuren ninhydrinpositiver Substanz Folgen der langen Lagerung sind oder auch frisch bereitetem Material anhaften, soll an neuem Bang-antigen überprüft werden.

¹⁹ *L. W. Oeholm*, Z. physik. Chem. 50, 309 (1905).

²⁰ *H. Michl*, Mh. Chem. 82, 489 (1951).

Experimenteller Teil.

Papierchromatogramme.

(Diese wurden in dankenswerter Weise von Herrn Dr. K. Riedl durchgeführt.)

Hydrolyse. 0,07 g Substanz wurden mit 10 ml 6 n Salzsäure unter Rückfluß 24 Stdn. erhitzt. Darnach wurde von den Hüminsubstanzen abzentrifugiert und die Lösung im Vak. zur Trockne eingedampft. Nach Zusatz von Wasser wiederholte man diese Operation mehrmals, um die überschüssige Salzsäure weitestgehend zu entfernen. Der Rückstand wurde in möglichst wenig Wasser gelöst und diese Lösung direkt zu den papierchromatographischen Versuchen verwendet.

Eindimensionale Chromatogramme. Die eindimensionalen Papierchromatogramme, die speziell zur Nachprüfung von Arginin und Histidin ausgeführt wurden, entwickelten wir absteigend in Glaszylindern. Es wurden meist 8 μ l des Hydrolysats aufgetragen und als Lösungsmittel die obere Phase eines Gemisches aus Butanol-Eisessig-Wasser²¹ (4 : 1 : 5) verwendet. Neben dem Hydrolysat wurden die entsprechenden Vergleichsaminosäuren wandern gelassen. Die Sichtbarmachung erfolgte durch die bekannten spezifischen Farbreaktionen.

Zweidimensionale Chromatogramme. Diese wurden in *Dent*-Kästen²² ausgeführt. Als Filtrierpapier verwendete man *Whatman* Nr. 1. Es wurden zirka 15 μ l der Lösung in einer Entfernung von je 6 cm von beiden Rändern aufgetragen. Es wurde immer zuerst in der Längsrichtung des Papiers mit dem Gemisch Butanol-Pyridin-Wasser (20 : 6 : 10) entwickelt, wobei möglichst die ganze Länge des Bogens ausgenützt wurde. Nach Entfernen des unteren Stückes des Papiers, das die extrahierten Verunreinigungen der Cellulose enthält, wurde unter Einhalten der entsprechenden Vorkehrungen gegen Oxydation mit der unteren Phase eines Gemisches aus Phenol-0,2% Ammoniak (1 : 1)²² in der zweiten Richtung entwickelt. Zur Sichtbarmachung der Aminosäuren diente eine 0,1%ige Lösung von Ninhydrin in Butylalkohol.

Stickstoffverteilung.

Wir greifen aus unseren Versuchsreihen das folgende Beispiel heraus:

80 mg Antigen wurden mit 2 ml 10%iger Schwefelsäure 10 Stdn. lang gekocht. Dann wurde mit destilliertem Wasser in ein Zentrifugenglas gespült und auf 10 ml gebracht. Hierauf versetzte man vorsichtig mit Bariumkarbonat bis pH 2. Der Niederschlag von Bariumsulfat wurde abzentrifugiert und 3mal mit je 5 ml heißem Wasser ausgewaschen. Bereits beim 2. Waschwasser war die Diazoreaktion negativ. Der Stickstoffgehalt des ausgewaschenen Niederschlages von Bariumsulfat und Hüminsubstanzen wurde nach *Kjeldahl* bestimmt (die Stickstoffwerte sind im theoretischen Teil angegeben).

Das Filtrat vom Bariumsulfat wurde mit dem stark eingeeengten Waschwasser vereinigt und auf 2 ml gebracht. Nun wurde frisch gefälltes Silberoxyd bis pH 3 zugesetzt und tropfenweise vorsichtig mit einer gesättigten Silbersulfatlösung versetzt, bis kein Niederschlag mehr auftrat. Der entstandene gelbliche Niederschlag wurde abzentrifugiert, 3mal mit 1%iger

²¹ S. M. Partridge, *Biochemic. J.* 42, 238 (1948).

²² C. E. Dent, *Biochemic. J.* 43, 169 (1948).

wäbr. Silbersulfatlösung gewaschen und der Stickstoffgehalt der so erhaltenen Purinbasenfraction bestimmt.

Zu dem mit dem stark eingeeengten Waschwasser vereinigten Filtrate wurde nun Silberoxyd und anschließend Silbersulfat gegeben, bis beim Tüpfeln mit Barytwasser eine braune und nicht mehr eine gelbe Fällung entstand. Die zum Tüpfeln verwendete Flüssigkeit wurde nun mit wenig Wasser in das Zentrifugenglas zurückgespült und mit Bariumkarbonat nach *Vickery* und *Leavenworth*²³ gefällt. Im Niederschlag mußten sich Histidin und die Monoaminodikarbonsäuren befinden. Er wurde nach 3maligem Waschen solange mit verd. Salzsäure ausgekocht, bis diese keine positive Diazoreaktion mehr gab (4mal). Dann wurde zur Trockne eingeeengt und mit 1,5 ml 5%iger Salzsäure aufgenommen; hierauf wurde durch tropfenweisen Zusatz von 10%iger Phosphorwolframsäurelösung das Histidin gefällt. Nach 3maligem Auswaschen des 1 Tag alten Niederschlages mit verd. Phosphorwolframsäurelösung wurde der Stickstoffgehalt des Niederschlages (Histidin) und des Filtrats samt Waschwässern (Monoaminodikarbonsäuren) bestimmt.

Das Filtrat nach der Histidinfällung wurde wieder mit den bis auf wenige Zehntel Milliliter eingeeengten Waschwässern vereinigt und mit Barytwasser auf pH 10 bis 11 gebracht. Der ausfallende braune Niederschlag enthielt das Arginin neben überschüssigem Silberoxyd. Nach dem Waschen wurde sein Stickstoffgehalt bestimmt.

Filtrat und Waschwässer wurden wieder auf 2 ml eingeeengt, nachdem mit verd. Schwefelsäure die überschüssigen Bariumionen entfernt worden waren. Der geringfügige Niederschlag erwies sich als stickstofffrei. Nun wurde die Lösung auf einen Schwefelsäuregehalt von 5% gebracht und mit 10%iger Phosphorwolframsäure das Lysin gefällt. Nach 1tägigem Stehen wurde der Niederschlag abzentrifugiert, ausgewaschen und der Stickstoffgehalt bestimmt.

Das Filtrat nach der Lysinfraction enthielt die Monoaminomonokarbonsäuren, deren Stickstoff ebenfalls bestimmt wurde.

Fällungsreaktionen.

Fraktionierte Alkohol-fällung. Ein eingeeengter Hitzeextrakt (2%ig an Trockensubstanz) wurde mit Alkohol bis zu einem Gehalt von 50% versetzt. Es bildete sich schnell ein flockiger Niederschlag, der abgeschleudert wurde. Nach 3maligem Waschen mit 50%igem Alkohol trocknete man im Vak. über Silikagel. Es resultierte eine graubraune, spröde Masse, die sich nur mehr schwer in Wasser löst.

Zu dem gelbgefärbten Filtrat wurde Alkohol bis zu einem Gehalt von 90% gefügt und die Fällung abzentrifugiert. Nach Waschen und Trocknen erhielt man eine gelbe, bröselige Substanz, die sich im Gegensatz zur ersten Fraction leicht in Wasser löste.

Fällung mit Bleiazetat. Eine 0,5%ige Antigenlösung wurde 0,5%ig an Essigsäure gemacht und dann tropfenweise mit einer 10%igen Bleiazetatlösung versetzt, bis keine Fällung mehr auftrat. Der Niederschlag wurde abzentrifugiert, gewaschen und mit einer 2%igen Schwefelsäure zerlegt.

Fällung mit kolloidalem Zinkhydroxyd. Eine 0,5%ige Antigenlösung wurde mit Bariumhydroxyd kalt gesättigt und mit einer 5%igen Zinksulfatlösung bis zur Entfärbung von Phenolphthalein (Tüpfeln) versetzt.

²³ H. B. *Vickery* und Ch. S. *Leavenworth*, J. biol. Chemistry 72, 403 (1927).

Der Niederschlag wurde mit H_2S zerlegt, das Antigen herausgelöst und mit der 10fachen Alkoholmenge gefällt.

Fällung mit Uranylazetat. Die 0,5%ige Antigenlösung wurde 1%ig an Essigsäure gemacht und mit einer 5%igen Lösung von Uranylazetat gefällt. Der Niederschlag wurde abzentrifugiert und gewaschen. Nach Lösen in 2 n NaOH führte man direkt die Probe auf Arginin nach *Sakaguchi* durch.

Diffusionsversuche.

Konzentration der Lösung vor Versuchsbeginn: 2,94 mg/ml. Versuchsdauer: 8 Tage, Temp. 15° C.

Der Gehalt an Pentosen wurde kolorimetrisch mit Hilfe der *Bial*-Reaktion²⁴ bestimmt, der der Hexosen durch die Diphenylamin I-Probe²⁵, der des Arginins durch die Reaktion nach *Sakaguchi* und schließlich der Stickstoffgehalt nach *Kjeldahl*. Die angegebenen Extinktionen sind auf 1 ml der untersuchten Lösung bezogen.

	Pentosen Extinktion bei 6100 Å	Hexosen Extinktion bei 5300 Å	Arginin Extinktion bei 5000 Å	Stickstoff mg/ml
Ursprüngliche Konzentration ..	0,720	1,524	0,383	0,144
Konzentration nach Beendigung des Versuches in 0,96 cm Höhe	0,181	0,383	0,096	0,036
Konzentration in 2,88 cm Höhe	0,022	0,040		

²⁴ T. Valyi-Nagy, Z. Vitamin-, Hormon- u. Fermentforsch. 1, 279 (1948).

²⁵ Z. Dische, Mikrochem. 7, 36 (1929).