

Acta Medica Okayama

Volume 4, Issue 4

1934

Article 2

DEZEMBER 1935

Studien über die Isolierung von Antikörpern (mit besonderer Berücksichtigung des hypotonischen Mediums).

Harumi Suma*

*Okayama University,

Copyright ©1999 OKAYAMA UNIVERSITY MEDICAL SCHOOL. All rights reserved.

Studien über die Isolierung von Antikörpern (mit besonderer Berücksichtigung des hypotonischen Mediums).*

Harumi Suma

Abstract

1. Es gibt bei der Isolierung des Antikörpers von sensibilisiertem Antigen je nach den Mediumarten einen wirksamsten Temperaturgrad. a) Beim Warmedium ist für dieses Problem eine Warapplikation bei 55°C; am zweckmäßigsten. b) Bei hypotonischem Medium, und zwar bei einer 0.034%igen Kochsalzlosung, zeigt sich das beste Resultat gerade bei einer Warapplikation von 60°C;. c) Die Temperatur von 65°C; eignet sich für das Medium von physiologischer Kochsalzlosung. Unter geeigneten Bedingungen wird ein größerer Teil der Antikörper innerhalb einer viertel Stunde befreit. 2. Der beere Isolierungseffekt des hypotonischen Mediums (0.034%) bei der Warapplikation gilt für die Prazipitin-, Bakterienagglutinin-, Hamolysin- und Hamoagglutininisolierung. 3. Aus folgenden Tatsachen kann man schließen, daß bei der Isolierung des Antikörpers die Bindung zwischen Antigen und Antikörper stark hemmend wirkt: a) Native, bei 60°C; und bei 100°C; (2 St.) erhitzte Kolibazillen absorbieren mehr Agglutinin als bei 80°C;- 100°C; (1 St.) und über 100°C; erhitzte. b) Aus bei 100°C; (2 St.) erhitztem Bazillenantikörperkomplex ist die größte Menge von Agglutinin trennbar. Je höher das Kolifiltrat erhitzt wird, desto weniger absorbiert es Immunkörper, läßt aber eine relativ große Menge wieder frei. 4. Zwischen Rohrzucker- und Warmedium besteht kein großer Unterschied in Bezug auf die Isolierung des Antikörpers. 5. Es ist wahrscheinlich, daß auch Elektrolyte eine Rolle bei den Isolierungsvorgängen spielen, obwohl noch viele andere Faktoren mitsprechen, und daß zweiwertige Ionen darum leistungsfähiger sind als einwertige, weil zweiwertige Ionen enthaltende Salze einen beeren Isolierungseffekt zeigen als einwertige. Zum Schluß mochte ich nicht verfehlen, Herrn Prof. Dr. M. Ogata für seine freundliche Anleitung und Anregung bei dieser Arbeit meinen herzlichsten Dank auszusprechen.

Aus dem Hygienischen Institut der Med. Fakultät Okayama
(Vorstand: Prof. Dr. M. Ogata.)

**Studien über die Isolierung von Antikörpern
(mit besonderer Berücksichtigung des
hypotonischen Mediums).**

Von

Harumi Suma.

Eingegangen am 24. Dezember 1934.

Das Problem der Reindarstellung oder Isolierung der Antikörper, frei von Immuneserum, ist von grundlegender Bedeutung für die Auffassung von ihrem Wesen und dem der Antikörperreaktion überhaupt, sowie von ganz besonderer, unmittelbarer Wichtigkeit für die praktische Medizin.

Die Antikörperwirkung ist aufs engste mit der Gegenwart von Serumeiweißkörpern verknüpft. Es war bisher nicht möglich, Lösungen mit Antikörperwirkung zu gewinnen, die sicher frei von Eiweiß waren. Jedoch zeigte die Gewinnung sehr eiweißarmer Lösungen deutlich, daß nur ein sehr kleiner Teil der Serumeiweißkörper als eigentlicher Träger der Antikörperfunktion in Betracht kommen kann. Für die Anschauung, daß die Antikörperwirkung zum mindesten in sehr engem Zusammenhange mit den Serumeiweißkörpern stehen müsse, spricht deren sonstiges Verhalten. Daher sind bis heute unter dem Gesichtspunkt der Gewinnung möglichst reiner Antikörperlösungen zahlreiche Untersuchungen durchgeführt worden.

Die Isolierungsweisen scheiden sich prinzipiell in 3 Methoden, nämlich in die chemische, physiologische und biologische Methode.

Die chemische Methode. Diese Methode bringt durch das Eiweißfällungsmittel auch den Antikörper zur Ausfällung, in dem erhaltenen Niederschlag findet sich der konzentrierte Antikörper.

*Tizzoni und Cattani*⁵³⁾ hatten im Jahre 1891 das Tetanusantitoxin durch Halbsättigung mit Ammonsulfat behandelt und das Antitoxin in der Globulinfraction vom Immuneserum nachgewiesen. *Widal et Sicard*⁵⁷⁾ behandelten 1897 das Immuneserum mit Magnesiumsulfat und fanden auch das Bakterienagglutinin im Serumglobulin. Sehr eingehende und vielseitige Untersuchungen über die Typhusagglutinine hat

dann *Winterberg*⁵⁸⁾ durchgeführt, aus denen er folgert, daß diese den Eiweißkörpern, speziell dem Globulin, anhaften. *Pick* gelang auch eine weitgehende Reinigung des Typhusagglutinins. *Brieger* und *Kraus*⁴⁾ gelang mit Ammonsulfat eine Ausschaltung von 75 % des ganzen Nitrogens von Diphtherieserum, während der Antitoxinwert unverändert blieb. Mittels dieser Fraktionsmethode werden zwar die Antitoxine konzentriert, aber trotzdem bleibt man bei dieser Methode von der Reindarstellung des Immunserums noch weit entfernt.

Die physiologische Methode. Hierbei handelt es sich um Reindarstellung der Immunkörper auf der Basis der Einwirkung physikalischer Faktoren, Elektrodialyse, Ultrafiltration u. a., auf die Immunsera.

Diese Isolierungsmethode wurde zuerst nach *Landsteiner*²⁵⁾, dann von *Hirschfeld* und *Klinger*⁹⁾, *Pauli* und seinen Mitarbeitern⁴⁶⁾, *Michaelis* und *Rona*³⁰⁾ auf der Basis der kolloidtheoretischen Auffassung des Immunitätsproblems aufgebaut. Das Wesen der Veränderung, welche die charakteristischen Fähigkeiten des Immunserums bedingt, beruht auf kolloidalen Zustandsänderungen der Serumproteine, in erster Linie des Globulins.

*Aronson*¹⁾, dann *Marschall* u. *Welker*³¹⁾ haben Adsorptionsmethoden zur Anwendung gebracht, von der Vorstellung ausgehend, daß die durch ihren besonderen Dispersionszustand charakterisierten wirksamen Globuline sich bei der Adsorption anders verhalten müßten als die unwirksamen Serumproteine. Unter Annahme der Dispersitätsänderung eines Kolloids ist *Bechhold*⁵⁾ mit Ultrafiltration die Trennung der wirksamen Kolloide gelungen. *Gierns* und *Goldy*⁶⁰⁾ konnten mit dieser Methode eine 1- bis 3-fach erhöhte Wirksamkeit der auf dem Filter bleibenden Fraktion erreichen. *Hensval*¹⁰⁾ stellte mit Ultrafiltration durch Kollodiummembrane fest, daß ein Teil des Pseudoglobulins und Antitoxins durch die Membran hindurchgeht und der größere Teil der Antitoxine auf dem Filter zurückbleibt. *M. u. N. Stern*³²⁾ konnten das Globulin auf dem Filter zurückhalten.

Die Reindarstellung bestimmter Eiweißfraktionen aus dem Serum und damit der Antikörper hat aber in den letzten Jahren durch die Elektrodialyse eine neue Basis gewonnen. Nach *Pauli*⁶¹⁾ gelingt die vollständige Trennung der hydrophilen Albumine von dem hydrophoben Globulin durch Elektrodialyse. Auch *Lock* u. *Hirsch*⁶²⁾ hatten die Elektrodialyse zur Isolierung des haemolytischen Ambozeptors mit Erfolg benutzt. In der letzten Zeit haben *Bechhold* u. *Rosenberg*⁶⁾ eine Kombination von Ultrafiltration und Elektrodialyse als Reinigungsmethode für Kolloide veröffentlicht. Daraufhin wurde diese von *Laubenheimer* und *Vollmar*²⁵⁾ zur Isolierung des Hämolysins in Anwendung gebracht. Vor kurzem ist auch *Asaba*²⁾ mit Elektrodialyse die Trennung von Serumpräzipitinen gelungen. Im übrigen wäre noch die Gefrierungsmethode des Serums zu nennen, über welche von *Hata*⁶³⁾ und neuerdings von *Sumi*⁵¹⁾ berichtet wurde.

Die biologische Methode. Diese Methode ging von der Zugrundelegung der Reversibilität aus, nach der sich die Antikörper mit den Antigenen binden und sich dann von diesen wieder trennen lassen.

Die ersten Versuche haben 1900 *Hahn* und *Tremsdorff*¹¹⁾ beschrieben. Sie konnten einen Teil der Agglutinine des Typhus- und Choleraserums durch Abspal-

tion aus den spezifischen Niederschlägen mittels schwacher Lauge oder Säure wiedergewinnen. *Landsteiner*²⁵⁾ sowie *Landsteiner* und *Jagic*²⁷⁾ verwendeten diese Methode bei der Isolierung des Hämagoagglutinins und fanden die Isolierung proportional zu dem Temperaturanstieg des Mediums. *Lieberman* und *v. Fenyvessy*²⁸⁾ gelang es auch durch Behandlung mit $n/100$ Salzsäure die Hämolyse und Hämagoagglutinine zu isolieren. *Matsui*²³⁾ isolierte Typhusagglutinine aus dem Agglutinat, das sich bei der Verbindung von Typhusbazillen und Immenserum bildet. *Israel Weinstein*¹⁷⁾ isolierte aus dem Präzipitat, welches aus Typhusbazillen und Immunkörpern besteht, die Agglutinine sowie komplementbindende und bakterizide Antikörper. *Chikering*⁷⁾ gelang der Nachweis, daß die Schutzkraft des Serums vollkommen in den Niederschlag übergeht, der mit einem geeigneten Pneumokokkenantigen entsteht. *Kosakai*²¹⁾ hat die Hämolyse aus roten Blutkörperchen in Rohrzuckermedien isoliert und bemerkt, daß Temperatur und Volumen eine große Rolle spielen.

Weiter ist auch *Furuhata*¹²⁾ die Isolierung der Hämagoagglutinine und *Ogata*⁴¹⁾ die der Bakterienagglutinine unter Einwirkung von Natronlauge gelungen. *Miwa*³⁷⁾ gelang es, die Typhusagglutinine in destilliertem Wasser zu isolieren. *Huntoon*¹³⁾ konnte mit destilliertem Wasser, Traubenzucker und physiologischer Kochsalzlösung die Antipneumokokken-Immuns substanz isolieren und nachweisen, daß die Trennung nie vollständig ist und daß sie abhängt von der Art der Antikörper, von der Stärke der Sensibilisierung, vom Volumen, von der Temperatur und vom Milieu, in dem die Digestion erfolgt.

In neuerer Zeit gelang es *Sunouchi*⁵²⁾ das Serumpräzipitin zu isolieren, was bisher als sehr schwierig angesehen wurde, und seitdem hat die Isolierung des Präzipitins große Fortschritte gemacht. Auch hat er auf Grund desselben Gedankenganges Hämagoagglutin und Hämolyse in physiologischem Kochsalzmedium rein dargestellt. *Kageyama*⁶⁵⁾ hat die *Forsmannschen* Antikörper isoliert. *Haku*¹⁴⁾ isolierte auch nach obiger Methode das Bakterienpräzipitin und hat verschiedene Antikörper als ganz identische Substanzen erhalten. *Kuwana*²²⁾ hat in hypertonischem Medium das Serumpräzipitin mit gleichem Erfolg wie in destilliertem Wasser isolieren können. *Inoue*¹⁸⁾ gelang die Isolierung des Bakterientropins in salzfreiem Medium.

Außerdem gibt es noch eine biologische Methode unter Anwendung der Reversibilität durch spezifische Affinität.

Wenn man einem bereits gebildeten Niederschlag aus Antigen und Antikörper bei der Präzipitationsreaktion nachträglich weiteres Antigen hinzufügt, so wird der Niederschlag aufgelöst (*Halban* und *Landsteiner*¹⁵⁾). Diese Erscheinung ist nicht anders deutbar, als daß aus der bereits bestehenden Verbindung zwischen Antigen und Antikörper letzterer auf das neu hinzugefügte Antigen übergeht. Direkt läßt sich dieser Übersprung des Antikörpers auf das neu hinzugefügte Antigen durch den Übersprungsversuch von *Morgenroth*³⁴⁾ zeigen, der sodann von *Philosofow*⁴⁷⁾, *Kawashima*²³⁾, *F. Rosenthal*⁵⁶⁾, *Morgenroth* und *Bieling*³⁵⁾ u. a. geprüft worden ist. Sehr bemerkenswert erscheint es, daß auch die Wiedergewinnung unspezifischer, an Suspension, wie Kaolin u. a., adsorbierter Antikörper augenscheinlich von sehr ähnlichen Bedingungen beherrscht wird wie die Befreiung der Antikörper aus ihrer spezifischen Bindung (*Olitzki*⁴²⁾, *Tropp*⁵⁴⁾, *Masuda*³⁶⁾).

Vorbereitung und Untersuchungsmethode.

I. Immunisierungsmethode.

1) *Präzipitin.* Als Präzipitin babe ich das Anti-Rinder-Serum des erwachsenen Kaninchens benutzt. Ich habe mit 0.5 cc Rinderserum das Kaninchen oftmals, in allen Fällen über 5 mal, immunisiert und 7 Tage nach der letzten Injektion nach der *Ogataschen*⁴³⁾ Methode den Titer, die Bindungszone und den Verdünnungstiter des Serums für das Antigen bestimmt. Es ist nötig, für die Isolierungszwecke hochwertiges Präzipitin herzustellen. Daher habe ich immer Präzipitin vom Verdünnungstiter über 1000 benutzt.

2) *Bakterienagglutinin.* Als Bakterienagglutinin habe ich das Anticoliserum des Kaninchens angewandt. Eine 18 stündige Schrägagarkultur des Colibazillus wurde zu 3 Normalösen in Kochsalzlösung emulsiert und darauf im Wasserbad von 60°C in 2 Stunden abgetötet. Dem Kaninchen wurden aufsteigende Dosen (2, 3 und 5 cc) bei 4-tägigen Pausen mehrmals intravenös injiziert; 7 – 10 Tage nach der letzten Injektion wurde das Blut aus der Carotis entnommen. Das Serum wurde durch ein halbstündiges Erwärmen bei 56°C inaktiviert und dann in einem Eisschrank aufbewahrt.

3) *Hämolyisin.* Dem Kaninchen wurden jeden fünften Tag 5 mal 5 cc von gewaschenem, 10 %igem defibriniertem Ziegenblut injiziert, 7 Tage nach der letzten Injektion wurde der Titer des Serums bestimmt und das Immunserum bei 56°C 30 Minuten lang inaktiviert.

4) *Hämoagglutinin.* Das Hämoagglutinin wurde dadurch erzeugt, daß das Kaninchen jeden fünften Tag 5 mal mit 5 cc von gewaschenem, 10 %igem defibriniertem Hühnerblut injiziert wurde; 7 Tage nach der letzten Injektion wurde das Blut entnommen. Auch wurde es bei 56°C 30 Minuten lang inaktiviert.

II. Präzipitation.

Präzipitinogen. Als Präzipitinogen wurden Rinderserum und Colifiltrat verwendet. Das Colifiltrat wurde folgendermaßen behandelt: eintägige Agarkultur wurde in sterilem destilliertem Wasser aufgeschwemmt, eine Stunde lang bei 60°C weiter stehengelassen, zwei Tage lang bei 37°C gehalten, danach durch *Berkefeld*-Kerze filtriert. Ihr Eiweißgehalt entspricht 1 : 1,000 der Serumeiweißmenge. Vor dem Versuch wurde Kochsalz bis zu einem Gehalt von 0.85 % zugesetzt.

Zur Präzipitinbestimmung benutzte ich folgende 2 Methoden:

a). *Uhlenhuthsche Methode.* Diese Methode zeigt die Verdünnungsgrenze des Antigens, das mit dem Präzipitin reagierbar ist. Ich gebrauchte sie nur zur Antigengehaltsbestimmung.

b). *Immunkörperverdünnungsmethode.* Diese Methode ist von Prof. *Ogata*⁴³⁾ zum ersten Male veröffentlicht worden. Wenn die in absteigender Weise verdünnten Präzipitinogene auf das Immunserum, welches mit 10 % Meerschweinchenserum oder 1 % Gummikochsalzlösung in gleicher Weise verdünnt wurde, überschichtet werden, so ist die Reaktion am stärksten bei einem gewissen Grad der Antigenverdünnung. Diese geeignete Antigenverdünnung wird als „Bindungszone“ (B.Z.) des Immunserums bezeichnet. Der „Verdünnungstiter“ (V.T.) ist der höchste Antikörper-

verdünnungsgrad, der bei der Bindungszone reagierbar ist.

Es läßt sich daher an der Bindungszone die Eigenschaft des Antikörpers und am Verdünnungstiter die Menge des Antikörpers nachweisen.

III. Agglutination.

Bazillenemulsion. 3 Normalösen von 18-stündiger Schrägagarkultur von Koli-bazillen wurden in 10 cc Kochsalzlösung gemischt, gleichmäßig aufgeschwemmt und dann durch 2-stündiges Erwärmen bei 60°C abgetötet.

Untersuchungsmethode: 4 Tropfen dieser Bazillenemulsion wurden je 1 cc von in absteigender Weise verdünntem Immuneserum zugesetzt. Dieses Gemisch wurde 2 Stunden bei 37°C im Brutschrank gehalten, dann der Zimmertemperatur ausgesetzt und am nächsten Morgen mit dem Agglutinoskop beobachtet.

IV. Hämolyse.

Frisches Ziegenblut wurde defibriniert und 3 mal mit Kochsalzlösung gewaschen. 1 cc von 2.5 %igem Ziegenblut und die doppelte Dosis von Komplement (Meerschweinchenserum) und im absteigender Weise verdünntem Immuneserum wurden gemischt, dann wurde die Mischung 2 Stunden im Brutschranke bei 37°C stehen gelassen und über Nacht im Eisschrank gehalten; sodann wurde abgelesen.

V. Hämagoagglutination.

Je 4 Tropfen von 2 %iger Hühner-rote-Zellen-Suspension wurden dem in absteigender Weise verdünnten Immuneserum zugesetzt, 2 Stunden lang im Brutofen digeriert und dann über Nacht im Eisschrank aufbewahrt. Das Resultat wurde am nächsten Morgen abgelesen.

Experiment.

1. Bindung.

Das Mengenverhältnis zwischen Antigen und Antikörper spielt eine große Rolle für die Isolierung der Immuns substanz aus diesen beiden gebundenen Stoffen. Wenn das Antigen mit Antikörper übersättigt wird, so wird der Antikörper viel leichter aus der Bindung befreit als bei schwach sensibilisiertem Antigen. Als Antigen wurden verschiedene Stoffe verwandt, wie Kolibazillen, Bazillenfiltrat, rote Zellen von Ziegen und solche von Hühnern. Die Antigene wurden zunächst in einem bestimmten Mengenverhältnis mit Immuneserum gemischt, worauf das Gemisch nach Schüttelung bei 37°C 2 Stunden lang digeriert wurde. Dabei kam die Agglutination oder Präzipitation im Reagenzglas zustande, doch bleibt ein Teil derselben im Abgußserum zurück. Durch Zentrifugieren wurde der Niederschlag von dem Serum getrennt. Danach wurde der Abguß vorsichtig in ein anderes Rohr abpipettiert, um den nicht gebundenen Immunkörper zu prüfen.

2. Waschung.

Der Bodensatz wurde 3 mal unter Zentrifugieren gut ausgewaschen, um den Serumrest möglichst zu beseitigen. Nach dieser 3-maligen Waschung waren keine nachweisbaren Präzipitine mehr im Waschwasser vorhanden. Dieses serumfreie Präzipitat wurde mit den entsprechenden verschiedenen Medien bis zur ursprünglichen Menge aufgefüllt.

3. Isolierung.

Nach starkem Schütteln wurden die Röhren 30 Minuten lang auf dem Wasserbad bei verschiedenen Temperaturen digeriert. Dabei wurden die gebundenen Immunkörper wieder befreit. Danach wurden diese Gemische durch Zentrifugierung wieder in Bodensatz und Abgüsse getrennt. Die Abgüsse wurden in andere Röhren abpipettiert. Da es für die Präzipitationsreaktion nötig ist, daß in allen Medien möglichst die gleiche Salzmenge enthalten ist, setzte ich den Abgüssen Kochsalzkristalle oder hypertonische Lösung bis zu einem Gehalt von 0.85 % der Lösung zu.

4. Medium und Temperatur.

Seit dem ersten Versuch von *Hahn* und *Trommsdorff*¹¹⁾, die die isolierten Agglutinine mittels schwacher Lauge oder Säure befreien konnten, wurden viele Anstrengungen zur Lösung dieses Problems gemacht. Es wurden, seit *Kosaka*²¹⁾ 10 %ige Rohrzuckerlösung als Medium benutzt und gute Erfolge erzielt hatte, große Fortschritte in der Isolierung erreicht, worauf *Furuhata*¹²⁾ das Hämöagglutinin und *Ogata*⁴¹⁾ das Bakterienagglutinin im Rohrzuckermedium erlangen konnte. Nach der Suggestion des Rohrzuckermediums verwendeten *Miwa*⁶⁴⁾ und *Furuhata*¹²⁾ destilliertes Wasser und erzielten ebenfalls gute Resultate. Neuerdings hat *Sunouchi*⁵²⁾ bei physiologischem Kochsalzmedium eine Trennung der Immuns substanz erreicht und fand dabei einen interessanten Zusammenhang zwischen dem Medium und der Temperatur für die Isolierung. Mit hypertonischem Salzmedium konnte *Kuwana*²²⁾ die gebundenen Antikörper frei machen, ebenso wie beim Salzmedium und bei physiologischem Kochsalzmedium.

Nach obigen Untersuchungen bei der Isolierung des Antikörpers aus dem Antigen-Antikörperkomplex lassen sich die nonelektrolyten Medien, wie Rohrzucker, destilliertes Wasser oder hypertonisches Medium als am geeignetsten erkennen. Da die Elektrolyte für die Antigen-Antikörperreaktion wichtig sind und bei hypertonischem Salzgehalt die Antikörperbindung bis zu einem gewissen Grade gehemmt wird, so wird bei diesen Medien die Antigen-Antikörperbindung zu einer Reversion gezwungen. Doch hat *Sunouchi*⁵²⁾ bei physiologischem Kochsalzmedium bei geschickter Temperaturanwendung ebenso gute Erfolge wie bei elektrolytefreiem Medium oder hypertonischer Lösung erzielt. Dabei bemerkte er, daß außer dem Medium die Wärmeapplikation eine wichtige Rolle spielt.

Bisher stimmten die verschiedenen Autoren bezüglich des Einflusses der Wärmeapplikation für die Isolierung nicht überein. *Pietro Rondoni*⁴⁴⁾ bemerkte keinen Unterschied für die Isolierung bei einer Wärmeapplikation zwischen 0° - 37°C. Dagegen fanden *Landsteiner*²⁵⁾ u. *Kosaka*²¹⁾, daß die Menge des freigewordenen

Antikörpers proportional mit der Temperaturhöhe des Mediums geht. *Sunouchi*⁵²⁾ hat als geeignete Temperatur für Isolierung in Kochsalzlösung eine Temperatur von 65°C gefunden. Dabei ist die Antikörpermenge dieselbe wie bei den anderen Isolierungsmethoden, im Zuckermedium oder Wassermedium.

Aus obigen Ausführungen ergibt sich die interessante Tatsache, daß bei Isolierung des Antikörpers, der mit den Antigenen gebunden worden ist, die Menge des freigewordenen Immunkörpers in inniger Beziehung zu der Temperatur und den Medien steht. Infolgedessen beschäftigte ich mich auf Anregung und unter Leitung von Prof. *Ogata* mit der Isolierung der Immuns substanz, wobei ich besonders das hypotonische Medium berücksichtigte, über das bis jetzt noch niemand berichtet hat.

Die Medien, in denen die Antikörper digeriert werden, sind so dargestellt, daß die physiologische Kochsalzlösung in absteigender Weise verdünnt wird, d. h. 1:1, 1:2, 1:5, 1:10, 1:25, 1:50, 1:100, 1:250, 1:500, Aq. dest. Die Wärme wird bei 45°C bis 70°C appliziert.

Experiment 1. Isolierung des Serumpräzipitins.

Zwar gibt es viele Untersuchungen über die Isolierung des Präzipitins mittels chemischer oder physiologischer Methoden, doch standen solchen mittels biologischer Methoden vielerlei Schwierigkeiten entgegen, bis die Titerbestimmung des Präzipitins nach der Verdünnungsmethode veröffentlicht war, und die Schwierigkeiten von *Sunouchi*⁵²⁾ als erstem überwunden worden waren.

Es ist sehr wichtig, das geeignete Mengenverhältnis zwischen Antigen und Antikörper für die Bindung und Isolierung zu finden. Die Niederschlagsbildung hängt von bestimmten Mengenverhältnissen der an der Reaktion beteiligten Faktoren ab. Bei konstanter Präzipitinogenmenge und steigendem Präzipitin nimmt das Präzipitat zu, jedoch so, daß es nicht proportional steigt. Bei Steigerung der Präzipitinmenge nimmt die Präzipitatmenge nicht stetig zu, sondern erreicht ein Maximum. Bei gleichbleibender Präzipitinmenge und steigendem Präzipitinogengehalt erreicht der Niederschlag die Acme und sinkt dann wieder ab. Diese Mengenverhältnisse für das Bindungsvermögen haben *Hamburger*⁶⁶⁾, *Arrhenius*³⁾, *Eisenberg* und *Volk*⁸⁾, *Landsteiner*²⁹⁾ nachgewiesen. *Ogata*⁴³⁾ hat mittels der Verdünnungsmethode diese Beziehungen klarge stellt. *Sunouchi*⁵²⁾ bemerkte bei der Isolierung des Serumpräzipitins, daß die Antigenmenge, die zu der Präzipitininisolierung benutzt wird, einen großen Einfluß auf den Isolierungsquotienten ausübt. *Kuwana*²²⁾ untersuchte genau die Mengenverhältnisse zwischen Antigen und Antikörper, und kam zu folgendem Schluß. Die geeignetste Antigenmenge wird nach dem Titer des Präzipitins, der durch die Immuneserumverdünnung gezeigt wird, und nach der Bindungszone des Präzipitins für Antigen verschieden angegeben, und die zur Isolierung des Immunkörpers (1 cc) erforderliche Antigenmenge wird nach der Formel kurz folgendermaßen angezeigt: $a = 0.025 \times \frac{T}{Z}$ (a = die zur Isolierung geeignetste Menge des Antigens; Z = die Bindungszone des Immuneserums; T = der Präzipitintiter des Serums.)

Als Antigen gebrauchte ich Rinderserum und als Präzipitin Antirinderserum von Kaninchen. Das „geeignete“ Mengenverhältnis zwischen Antigen und Antikörper

wendete ich nach *Kuwana* an. Ich benutzte als Präzipitine beinahe gleich starke Immunsera, um die Isolierung bei allen Versuchen unter gleichen Bedingungen verfolgen zu können. 2 cc Antigen, welches $0.025 \times \frac{T}{Z}$ von Rinderserum in 1 cc enthält, wurde gemischt mit 2 cc Original-Immuns Serum. Dann folgt die Digerierung, Waschung und Isolierung.

Versuch 1. Isolierung bei 45°C.

Da die Temperaturerhöhung für die Isolierung günstig wirkt, so habe ich die Untersuchung mit 45°C angefangen. Bei diesem Versuche benutzte ich ein Präzipitin, das den Verdünnungstiter 1:1,000 nach der Verdünnungsmethode und die Bindungszone 1:250 besitzt. Die Abgüsse sind alle gleich vom Verdünnungstiter 1:500. Wie oben gesagt, wird die Bindung zwischen Antigen und Antikörper bei jedem Versuch unter gleichen Bedingungen angestellt; es bindet sich dabei hinzugefügtes Präzipitin halb mit Antigen fest und es bleibt im Abgüsse noch die andere halbe Präzipitinmenge frei. Dieser Überschuß von Präzipitin wird durch 3-maliges Waschen aus dem Bodensatz befreit. Im Abgüsse der dritten Waschlösung bleibt die Präzipitinreaktion immer negativ. Nach der Isolierung erhielt ich die in Tabelle 1 ersichtlichen Resultate. Bei diesem Fall der Isolierung zeigen bei Medien 1) - 6) alle Präzipitintiter (v. t.) 5, und bei Medien 7) - 10) alle 10. Da das Präzipitat dreimal stark gewaschen wurde und dabei kein Präzipitin vorhanden war, so stammt es wohl nicht aus dem Immuns Serum, sondern aus dem Niederschlag.

Tabelle 1. Isolierung bei 45°C.

Medium		Präzipitintiter (V.m.)		Bind. Quot.	Isolier. Quot.	Antigen-gehalt	N-Menge
Nr.	(NaCl)	Abgüsse	Isolierte Lösung				
1	1: 1	1: 500	1: 5	1: 2	1: 100	5: 100,000	0.0175
2	1: 2	"	1: 5	"	1: 100	5: 100,000	
3	1: 5	"	1: 5	"	1: 100	5: 100,000	
4	1: 10	"	1: 5	"	1: 100	5: 100,000	0.0245
5	1: 25	"	1: 5	"	1: 100	5: 100,000	0.028
6	1: 50	"	1: 5	"	1: 100	5: 100,000	
7	1: 100	"	1: 10	"	1: 50	10: 100,000	0.028
8	1: 250	"	1: 10	"	1: 50	10: 100,000	
9	1: 500	"	1: 10	"	1: 50	10: 100,000	
10	Aq. dest.	"	1: 10	"	1: 50	10: 100,000	0.0315

A. Serum; V.T. = 1:1,000 B.Z. = 1:250

N-Menge = 1.0115

Wenn wir die Differenz zwischen dem ursprünglichen Präzipitintiter des Immuns Serums und dem des Abgusses als Bindungsquotienten

und das Verhältnis zwischen den gebundenen und isolierten Präzipitinen als Isolierungsquotienten ansehen, so ergibt sich für den ersten 1:2, für den letzteren 1:100-1:50. Beim Kochsalzmedium zeigt der Isolierungsquotient 1:100, beim Medium von Aq. dest. 1:50. Hier tritt kein nennenswerter Überschuß von hypotonischem Medium auf. Im Punkte des Isolierungsquotienten steht das Medium von Aq. dest. voran.

Über ein Vorhandensein des Antigens in isoliertem Präzipitin wurde von *Kosakai*²¹⁾, *Miwa*⁶⁵⁾, *Sunouchi*⁵²⁾, *Haku*¹⁴⁾ und *Kuwana*²²⁾ berichtet.

Es ist schwierig, aber notwendig, das zur Verwendung gelangende Antigen nicht in die isolierten Lösungen hineinkommen zu lassen, weil die Antigene der Reaktion des isolierten Antikörper große Hindernisse bereiten. Doch ist es schwer, das Antigen ganz auszuschalten. Daher untersuchte ich immer die Antigenmenge, die in die Lösung übergeht.

Die Antigenmenge wurde mittels *Uhlenhuthscher* Methode bestimmt, indem die isolierte Lösung als Antigen auf ein bekanntes Immuneserum (Titer nach *Uscher* Methode 1:100,000) verdünnt überschichtet wurde. Bei der *Uschen* Methode zeigt der Präzipitintiter den Reaktionsgrad des Antigens gegen das Originalserum, daher ist sie für die Bestimmung der Antigenmenge anwendbar. Der Antigengehalt in den Lösungen zeigt in Medien 1)-6). 5:100,000, in Medien 7)-10) 10:100,000, d. h. 5:100,000 oder 10:100,000 vom Rinderserum gehen in die isolierten Lösungen über.

Es ist bei der Isolierung auch nötig, die Eiweißmenge in der isolierten Lösung zu können, weil man aus ihr auf die Beziehungen zwischen Antikörpermenge und Eiweiß schließen kann. So habe ich nach der *Kjehldahlschen* Methode in verschiedenen Medien den Stickstoffgehalt in jedem Falle bestimmt. Dabei fand ich, daß, je hypotonischer das Medium war, desto stärker sich die Eiweißmenge in der Lösung vermehrte. Im Kochsalzmedium war sie geringer als im Medium von Aq. dest..

Versuch 2). Isolierung bei 55°C.

Bei dieser Untersuchung wurde das Immuneserum von V. T. 1:1,000, B.Z. 1:500 angewandt. Die Abgüße sind alle von V. T. 1:500. Bindungsquotient 1:2. Isolierte Präzipitine zeigen in Medien 1)-4) den Titer 1:10, in Medien 5)-7) 1:25, in Medien 8)-10) 1:50; die Isolierungsquotienten sind dementsprechend 1:50, 1:20, 1:10. Es steigern sich also in allen Medien die Isolierungseffekte parallel mit der Temperatur. Auch bei diesem Fall ist der Isolierungsquotient im Medium von Aq. dest. am größten, im physiologischen Kochsalz-

Tabelle 2. Isolierung bei 55°C.

Medium		Präzipitintiter (V.m.)		Bind. Quot.	Isolier. Quot.	Antigen-gehalt	N-Menge
Nr.	(NaCl)	Abgüsse	Isolierte Lösung				
1	1 : 1	1 : 500	1 : 10	1 : 2	1 : 50	10 : 100,000	0.028
2	1 : 2	„	1 : 10	„	1 : 50	10 : 100,000	
3	1 : 5	„	1 : 10	„	1 : 50	10 : 100,000	0.0315
4	1 : 10	„	1 : 10	„	1 : 50	10 : 100,000	
5	1 : 25	„	1 : 25	„	1 : 20	10 : 100,000	0.0315
6	1 : 50	„	1 : 25	„	1 : 20	10 : 100,000	
7	1 : 100	„	1 : 25	„	1 : 20	20 : 100,000	
8	1 : 250	„	1 : 50	„	1 : 10	20 : 100,000	0.0385
9	1 : 500	„	1 : 50	„	1 : 10	20 : 100,000	
10	Aq. dest.	„	1 : 50	„	1 : 10	20 : 100,000	0.042

B. Serum; V.T. = 1 : 1,000 B.Z. = 1 : 500

N-Menge = 0.9870

medium am kleinsten, und beim hypotonischen Medium liegt er in der Mitte. Die Antigenmenge in der isolierten Lösung vermehrt sich im allgemeinen ebenfalls. In Medien 1) - 6) 10 : 100,000, in Medien 8) - 10) 20 : 100,000. Hier ist auch die Antigenmenge im Medium von Aq. dest. größer als im hypotonischen sowie physiologischen Kochsalzmedium. Der N-gehalt in der Lösung steigert sich im allgemeinen auch parallel mit der Temperatur. Er ist im Medium von Aq. dest. etwas größer als im anderem Medium.

Hier besteht auch keine bemerkbare Überlegenheit des hypotonischen Mediums für die Isolierung. Von der isolierten Antikörpermenge aus betrachtet, ist das Medium von Aq. dest. als das für die Isolierung geeignetste vorzuziehen, obwohl der Antigengehalt und der N-gehalt etwas größer ist gegenüber den anderen Medien.

Versuch 3). Isolierung bei 60°C.

Bei dieser Untersuchung ist das benutzte Immunsrum von V.T. 1 : 1,000, B.Z. 1 : 500. Bindungsquotient 1 : 2. Isoliertes Präzipitin: in Medien 1) - 3) 1 : 25, in Medien 4) - 6) 1 : 50, in Medien 7) - 10) 1 : 25. Die Isolierungsquotienten zeigen, jeder für sich, entsprechend 1 : 20, 1 : 10, 1 : 20.

Es ist interessant, daß das isolierte Präzipitin in den Medien 1) - 6) allmählich mit der Temperatur abnimmt, dagegen das im Medium 7) gleich wie in dem Falle von Versuch 2 gleich bleibt und das in den Medien 8) - 10) nicht nur stehen bleibt, sondern auch vermindert wird. Ich werde hier zunächst das hypotonische Medium den anderen vorziehen als dasjenige, welches den besten Isolierungseffekt hat.

besonderer Berücksichtigung des hypotonischen Mediums).

Besonders das Medium 5) ist in seiner Isolierungskraft am stärksten gegenüber den anderen Medien, d.h. ein 0.034%iges Kochsalzmedium übertrifft die anderen Medien gerade bei einer Wärmeapplikation von 60°C. Das isolierte Präzipitin im Medium von Aq. dest. ist bei der Wärmeapplikation von 60°C geringer als bei einer solchen von 55°C. Der Effekt von Medium Aq. dest. für die Isolierung hatte also bei einer Wärmeapplikation von 55°C seine Acme.

Tabelle 3. Isolierung bei 60°C.

Medium		Präzipitintiter (V.m.)		Bind. Quot.	Isolier. Quot.	Antigen-gehalt	N-Menge
Nr.	(NaCl)	Abgüsse	Isolierte Lösung				
1	1: 1	1: 500	1: 25	1: 2	1: 20	10: 100,000	0.0385
2	1: 2	"	1: 25	"	1: 20	10: 100,000	
3	1: 5	"	1: 25	"	1: 20	10: 100,000	
4	1: 10	"	1: 50	"	1: 10	10: 100,000	0.0455
5	1: 25	"	1: 50	"	1: 10	10: 100,000	0.0455
6	1: 50	"	1: 50	"	1: 10	20: 100,000	0.049
7	1: 100	"	1: 25	"	1: 20	20: 100,000	
8	1: 250	"	1: 25	"	1: 20	20: 100,000	
9	1: 500	"	1: 25	"	1: 20	40: 100,000	
10	Aq. dest.	"	1: 25	"	1: 20	40: 100,000	0.07

C. Serum; V.T. = 1:1,000 B.Z. = 1: 500

N-Menge = 1.0220

Dieses Resultat stimmt mit der Untersuchung von *Sunouchi*⁵²⁾ überein. *Sunouchi*⁵²⁾ untersuchte dieses mittels Aq. dest., indem er die Temperatur von 37°C - 55°C graduell steigerte und dabei die Menge des freigewordenen Präzipitins maß, und fand so ein Parallelgehen von Temperaturhöhe und isolierter Präzipitinmenge. Er konstatierte jedoch bei destilliertem Wassermedium als zweckmäßigste Temperatur 53°C - 55°C und bemerkte, daß eine höhere Temperatur dagegen schädigend wirkt.

Die Antigenmenge in der Lösung ist in physiologischem Kochsalzmedium 10:100,000, im 0.034%igen Kochsalzmedium (hypotonisches Medium) ist sie auch 10:100,000, im destillierten Wassermedium beträgt sie dagegen 40:100,000. Die N-Menge, die in die isolierte Lösung übergeht, ist in physiologischem Kochsalzmedium 0.0385 g in 100 cc, in 0.034%igem Kochsalzmedium 0.0455 g, also etwas größer, und im Medium von Aq. dest. noch größer und beträgt hier 0.07 g in 100 cc. Aus den günstigen Bedingungen für die Isolierung berechnet, d.h. durch einen Vergleich der isolierten Präzipitinmenge, des Antigengehaltes und der N-Menge, ist das 0.034%ige Kochsalzmedium am zweckmäßigsten für die Isolierung gerade bei dieser Temperatur.

Versuch 4). Isolierung bei 65°C.

Bei diesem Versuch wurde Immuserum von V.T. 1:1,000, B.Z. 1:500 gebraucht. Bindungsquotient 1:2. Nach der Isolierung bei 65°C weist, wie Tabelle 4 zeigt, das isolierte Präzipitin in Medien 1) - 4) 1:50, in Medien 5) - 8) 1:25 und in Medien 9) - 10) 1:10 vom Verdünnungstiter auf. Dementsprechend sind die Isolierungsquotienten 1:10, 1:20, 1:50.

Tabelle 4. Isolierung bei 65°C.

Nr.	Medium		Präzipitintiter (V.m.)		Bind. Quot.	Isolier. Quot.	Antigengehalt	N-Menge
	(NaCl)	Abgüsse	Isolierte Lösung					
1	1: 1	1: 500	1: 50	1: 2	1: 10	20: 100,000	0.0455	
2	1: 2	"	1: 50	"	1: 10	20: 100,000		
3	1: 5	"	1: 50	"	1: 10	20: 100,000		
4	1: 10	"	1: 50	"	1: 10	20: 100,000		
5	1: 25	"	1: 25	"	1: 20	20: 100,000	0.063	
6	1: 50	"	1: 25	"	1: 20	20: 100,000		
7	1: 100	"	1: 25	"	1: 20	40: 100,000	0.063	
8	1: 250	"	1: 25	"	1: 20	40: 100,000	0.07	
9	1: 500	"	1: 10	"	1: 50	40: 100,000		
10	Aq. dest.	"	1: 10	"	1: 50	40: 100,000	0.0805	

D. Serum; V.T. = 1:1,000 B.Z. = 1:500

N-Menge = 0.9940

Bei diesem Versuch zeigt sich ein anderes Resultat als bei dem vorigen. Das Kochsalzmedium ist am günstigsten für die Isolierung, darauf folgt das hypotonische Kochsalzmedium, das Medium von Aq. dest. wird immer ungünstiger. Es läßt sich auch erkennen, daß, da das Kochsalzmedium bei 65°C den Isolierungsquotienten 1:10 hat, der Isolierungseffekt größer ist als bei 60°C. Dagegen hat das hypotonische Medium den von 1:20, der kleiner ist als der im vorigen Versuch, und das Aq. dest. Medium hat den von 1:50, der sich immer mehr erniedrigt. Der Antigengehalt beträgt in den Medien 1) - 6) 20:100,000, in den Medien 7) - 10) 40:100,000. Der N-Gehalt läuft etwa parallel mit dem Antigengehalt, wie aus der Tabelle ersichtlich ist. Im Kochsalzmedium beträgt er 0.0455 g, im hypotonischen Kochsalzmedium (0.034%) 0.063 g und im Aq. dest. Medium 0.0805 g in 100 cc. Aus allen diesen Bedingungen wird klar, daß bei dieser Temperatur der Isolierungseffekt des Kochsalzmediums den der anderen Medien übertrifft.

Das hypotonische Medium ist nicht imstande immer seine übertragende Rolle für die Isolierung zu behaupten, die es nur bei 60°C

spielt. Bei 65°C trat das hypotonische Medium von der ersten Stelle ab und das Kochsalzmedium kam zur Geltung. *Sunouchi*⁵²⁾ fand als beste Wärmeapplikation für Kochsalzmedium eine Isolierung bei 65°C. Sie ist auch bei meinem Versuch die geeignetste.

Versuch 5). Isolierung bei 70°C.

Originalserum von V.T. 1:1,000, B.Z. 1:1,000, Bindungsquotient 1:2. Wie aus der Tabelle 5 ersichtlich ist, beträgt das isolierte Präzipitin in den Medien 1)–4) 1:25, in den Medien 5)–8) 1:10, in den Medien 9)–10) 1:5 vom Verdünnungstiter. Der Isolierungsquotient beträgt beziehungsweise 1:20, 1:50, 1:100. Der Isolierungsquotient vermindert sich also im allgemeinen gegenüber dem letzten Versuch. Der Antigengehalt ist im Kochsalzmedium 20:100,000, im hypotonischen Kochsalzmedium 28:100,000, im Wassermedium 40:100,000. Der N-Gehalt beträgt im ersten 0.0525, im zweiten 0.07, im letzten 0.084 in 100 cc Lösung. Antigen- und N-Menge in der Lösung nehmen im allgemeinen gleichmäßig nach und nach zu, doch sind sie im Kochsalzmedium geringer als in den anderen Medien. Bei diesem Versuch wirkt das Kochsalzmedium auch noch günstiger als die anderen Medien.

Tabelle 5. Isolierung bei 70°C.

Medium		Präzipitintiter (V.m.)		Bind. Quot.	Isolier. Quot.	Antigen-gehalt	N-Menge
Nr.	(NaCl)	Abgüsse	Isolierte Lösung				
1	1: 1	1: 500	1: 25	1: 2	1: 20	20: 100,000	0.0525
2	1: 2	"	1: 25	"	1: 20	20: 100,000	
3	1: 5	"	1: 25	"	1: 20	20: 100,000	
4	1: 10	"	1: 25	"	1: 20	20: 100,000	
5	1: 25	"	1: 10	"	1: 50	20: 100,000	0.07
6	1: 50	"	1: 10	"	1: 50	40: 100,000	
7	1: 100	"	1: 10	"	1: 50	40: 100,000	
8	1: 250	"	1: 10	"	1: 50	40: 100,000	
9	1: 500	"	1: 5	"	1: 100	40: 100,000	0.084
10	Aq. dest.	"	1: 5	"	1: 100	40: 100,000	

E. Serum; V.T. = 1:1,000 B.Z. = 1:1,000

N-Menge = 0.9905

Aus den bisherigen Versuchen kann man einen allgemeinen Überblick über das Problem gewinnen. Es ist eine interessante Tatsache, daß bei der Isolierung des Antikörpers, der mit dem Antigen gebunden worden ist, die Menge des freiwerdenden Immunkörpers eine innige Beziehung zu der Temperatur zeigt. Es gibt jedoch eine

gewisse Acme der Temperatur für jedes Medium. Der Isolierungseffekt der Medien Aq. dest., hypotonische Kochsalzlösung, physiologische Kochsalzlösung, steigert sich mit der Temperatur, bis er bei jedem Medium die diesem eigentümlich Acme erreicht, die für das erste Medium bei 55°C, für das zweite bei 60°C und für das letzte bei 65°C liegt. Dann fällt im allgemeinen der Isolierungseffekt allmählich mit der Temperaturerhöhung ab.

Kurze Zusammenfassung.

Aus obigen Versuchen ist klar geworden, daß bei Isolierung von gebundenem Präzipitin der Isolierungseffekt des Mediums in innigem Zusammenhang mit der Temperatur steht. Die Menge freiwerdenden Antikörpers geht proportional mit der Temperaturhöhe des Mediums, doch gibt es eine Acme, die je nach den Medien verschieden ist. Antigengehalt und N-Menge nehmen mit der Temperatur zu, und zwar im Medium von Aq. dest. immer mehr als in hypotonischem und physiologischem Kochsalzmedium. Doch bei der Temperatur, die die jedem Medium eigentümliche Acme darstellt, zeigt sich der beste Effekt von den Gesichtspunkten der Isolierungsbedingungen aus betrachtet, nämlich der freigewordenen Antikörpermenge verglichen mit der Antigen- und N-Menge in den Lösungen. Die Temperatur von 55°C eignet sich für das Medium von Aq. dest., 60°C sind am zweckmäßigsten für hypotonisches Kochsalzmedium, das wirklich eine 0.034%ige Kochsalzlösung ist, und bei 65°C übertrifft das physiologische Kochsalzmedium die anderen Medien bei der Antikörperisolierung.

Experiment 2. Die zur Isolierung des Serumpräzipitins nötige Zeitdauer.

*Kosaka*²¹⁾ teilt mit, daß sich innerhalb von vier Stunden kein Unterschied für die Isolierung der Hämolyse zeigt. *Furuhata*¹²⁾ konnte durch eine halb- bis 4-stündige Digerierung keine Unterschiede nachweisen und meinte daher, eine halbe Stunde sei genug für die Isolierung. Auch *Ogata*⁴¹⁾ untersuchte den Einfluß der Zeitdauer und bemerkte, daß eine halbe Stunde zur Digerierung genüge. *Sunouchi*⁵²⁾ fand keine Unterschiede für die Isolierung des Präzipitins über eine viertel Stunde hinaus.

Auch ich untersuchte mittels zweier hypotonischer Medien bei verschiedenen Temperaturen, 30 Minuten im ganzen, die Isolierung des Präzipitins. Das erste Medium, in dem das Präzipitin digeriert wurde, war eine 0.034%ige Kochsalzlösung, das zweite war anfangs ein Wassermedium, in welches nach Ablauf von 15 Minuten bei der Digerierung sekundär Stückchen Kochsalzkristalle bis zur 0.034%igen

besonderer Berücksichtigung des hypotonischen Mediums).

Kochsalzlösung (hypotonische Lösung) hinzugefügt wurden. Mit diesen zwei Medien wurde die Digerierung bei 45°C bis 70°C ausgeführt. Originalserum von V.T. 1 : 1,000, B.Z. 1 : 500.

Tabelle 6. Einfluß d. Zeitdauer.

Temp.	Med.	Isolierte Präzipitin (V.m.)						Bind. Quot.	Isolier. Quot.	Antigen- gehalt	N-Menge
		2	5	10	25	50	100				
45°	I	+	+	-	-	-	-	1 : 2	1 : 100	5 : 100,000	
	II	+	+	+	-	-	-	„	1 : 50	10 : 100,000	
55°	I	+	+	+	+	-	-	„	1 : 20	10 : 100,000	0.035
	II	+	+	+	+	+	-	„	1 : 10	20 : 100,000	0.042
60°	I	+	+	+	+	+	-	„	1 : 10	20 : 100,000	0.042
	II	+	+	+	+	+	-	„	1 : 10	20 : 100,000	0.0455
65°	I	+	+	+	+	-	-	„	1 : 20	20 : 100,000	
	II	+	+	+	±	-	-	„	1 : 20(±)	40 : 100,000	
70°	I	+	+	+	±	-	-	„	1 : 50	20 : 100,000	0.077
	II	+	+	+	-	-	-	„	1 : 50	40 : 100,000	0.0805

Originalserum. V.T. = 1 : 1,000 B.Z. = 1 : 500

N-Menge = 1.0045

Aus der Tabelle ist ersichtlich, daß die isolierte Präzipitinmenge bei 45°C im ersten Medium 1 : 5, im zweiten Medium 1 : 10 vom Präzipitintiter zeigt. Die Antigenmenge ist dementsprechend 5 : 100,000, 10 : 100,000. Bei 55°C nahm das isolierte Präzipitin in beiden Medien gleichmäßig zu, war jedoch im ersten Medium 1 : 25, im zweiten Medium 1 : 50. Die Antigenmenge im isolierenden Medium war entsprechend 10 : 100,000 und 20 : 100,000. Die N-Menge betrug im ersten Medium 0.035 g im zweiten Medium 0.042 g in 100 cc. Bei 45°C und 55°C ist das zweite Medium günstig für die Isolierung. Bei 60°C war die isolierte Präzipitinmenge in beiden Medien gleich, nämlich 1 : 50 vom Präzipitintiter. Der Antigengehalt war im ersten Medium 20 : 100,000, im zweiten Medium 20 : 100,000. Die N-Menge betrug im ersten Medium 0.042, im zweiten Medium 0.0455 g in 100 cc Lösung. Bei 65°C war die isolierte Präzipitinmenge im ersten Medium 1 : 25, im zweiten Medium 1 : 25. Das Antigen betrug im ersten Medium 20 : 100,000, im zweiten 40 : 100,000. Bei 70°C: isolierte Präzipitinmenge: im ersten Medium 1 : 10, im zweiten 1 : 10 vom Präzipitintiter. Antigengehalt: im ersten Medium 20 : 100,000, im zweiten 40 : 100,000. N-Menge: im ersten Medium 0.077 g, im zweiten 0.0805 g.

Es ist bemerkenswert, daß bei 45°C und bis 55°C die isolierte

Präzipitinmenge im zweiten Medium größer war als im ersten. Da für die zweite Hälfte der Zeit die Bedingungen bei beiden Medien gleich waren, so entstammte die Differenz in der Präzipitinmenge nur dem Unterschied der Bedingungen in der ersten Hälfte der Zeit. Das ist auf die eine viertel Stunde lange Einwirkung einerseits der Wasserlösung zurückzuführen. Bei 60°C sieht man keine bemerkbaren Unterschiede in der isolierten Präzipitinmenge, obwohl in der ersten Zeithälfte die Bedingungen verschieden waren. Bei 65°C und 75°C ergibt sich auch keine nennenswerte Differenz in der isolierten Präzipitinmenge zwischen beiden Medien, wenn auch im Wassermedium die Reaktion etwas schwächer war.

Nach den obigen Untersuchungen muß der größte Teil der isolierten Präzipitine sich in der ersten viertel Stunde aus dem Präzipitat ausgeschieden haben.

Experiment 3. Isolierung des Bakterienagglutinins.

Über die Versuche zur Isolierung des Bakterienagglutinins durch Abspaltung aus den durch dieses bewirkten spezifischen Niederschlägen ist bereits in der Einleitung eingehend berichtet worden.

Bakterienagglutinin konnten auf diesem Wege Hahn und Trommsdorff¹¹⁾, Huntoon¹³⁾, Israel Weinstein¹⁷⁾, Ogata⁴¹⁾, Miwa⁶⁴⁾ mit gutem Erfolg frei machen.

Als Antigen gebrauchte ich dreimal gewaschene Kolibazillen. Zwei Schrägagarkulturen (18-stündige) werden mit physiologischer Kochsalzlösung aufgeschwemmt; jede Bazillenemulsion wurde 3-mal gewaschen. Die gewaschenen Bazillen wurden mit Kochsalzlösung wieder auf 2 cc gebracht, dann wurden sie mit inaktiviertem Immuns serum von 2 cc gemischt, worauf die Mischungen nach Schütteln bei 37°C im Brutofen aufbewahrt wurden. Hier tritt Agglutination auf, d.h. die Agglutinine verbinden sich mit den Bakterien. Das Gemisch wurde zentrifugiert, die Abgüsse wurden abpipettiert. Dann erfolgte Waschung und Digerierung.

Als Medien benutzte ich, wie bei dem Exp. 1), physiologische Kochsalzlösung, verschiedene hypotonische Kochsalzlösung und Wassermedium. Die Versuche wurden wie bei der Präzipitinisolierung ausgeführt.

Versuch 1). Isolierung bei 60°C.

Originalserum, Agglutinintiter von 1 : 10,000. Abgüsse: 1 : 2,500 vom Agglutinintiter, berechnet auf Originalserum. So ist der Bindungsquotient 7.5 : 10. Isolierte Agglutinine: in Medien 1) - 3) 1 : 250, in Medien 4) - 6) 1 : 500, in Medien 7) - 9) 1 : 250 vom Agglutinintiter. Isolierungsquotienten sind beziehungsweise in Medium 1) - 3) 1 : 30

besonderer Berücksichtigung des hypotonischen Mediums).

in Medium 4) - 6) 1 : 15, in Medium 7) - 9) 1 : 30. Bei 60°C sind die Medien 4) - 6), besonders 5) am günstigsten für die Isolierung des Bakterienagglutinins. Das gleiche Verhältnis wie bei der Isolierung des Präzipitins wurde auch hier beobachtet.

Tabelle 7.
Isolierung des Bakterienagglutinins bei 60°C.

Medium		Isolierte Agglutinine										Bind. Quot.	Isolier. Quot.
Nr.	(NaCl)	25	50	100	250	500	1,000	2,500	5,000	10,000	20,000		
1	1 : 1	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	7.5 : 10	1 : 30
2	1 : 2	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	"	1 : 30
3	1 : 5	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	"	1 : 30
4	1 : 10	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	"	1 : 15
5	1 : 25	+	+	+	+	+	±	-	-	-	-	"	1 : 15
6	1 : 50	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	"	1 : 15
7	1 : 100	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	"	1 : 30
8	1 : 250	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	"	1 : 30
9	Aq. dest.	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	"	1 : 30
	Abgüsse	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-		
	Original	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-		

Aus dem Versuch konstatierte ich, daß bei 60°C die hypotonische Kochsalzlösung (besonders 0.034%) auch die erste Stelle für die Isolierung des Bakterienagglutinins einnimmt, ebenso wie bei der Isolierung des Präzipitins.

Daher habe ich den folgenden Versuch angestellt.

Versuch 2). Isolierung des Agglutinins bei verschiedenen Temperaturen.

In zweiter Linie habe ich die Agglutininisolierung bei verschiedenen Temperaturen, 45°C, 55°C, 60°C, 65°C, 70°C mittels physiologischen Kochsalzmediums, 0.034%igen Kochsalzmediums und Wassermediums untersucht. Originalserum von Agglutinintiter: 1 : 20,000. Abgüsse: 1 : 5,000 vom Agglutinintiter, berechnet auf Originalserumvolumen. Bindungsquotient: 3 : 4.

Bei 45°C zeigt das isolierte Agglutinin in isotonischer Kochsalzlösung 1 : 100, in hypotonischem Medium 1 : 250, in Wassermedium 1 : 500. So ist bei diesem Fall das Wassermedium besser. Bei 55°C zeigt das isolierte Agglutinin im ersten Medium 1 : 250, im zweiten 1 : 500, im letzten 1 : 1,000 vom Agglutinintiter. Im allgemeinen ist

Tabelle 8. Isolierung des Bakterienagglutinins.

Medium		45°		55°		60°		65°		70°	
Nr.	(NaCl)	Iso. Agg.	Iso. Quot.								
1	0.85 %	1:100	1:150	1:250	1:60	1:500	1:30	1:1,000	1:15	1:500	1:30
2	0.034 %	1:250	1:60	1:500	1:30	1:1,000	1:15	1:500	1:30	1:250	1:60
3	Aq. dest.	1:500	1:30	1:1,000	1:15	1:500	1:30	1:500	1:30	1:250	1:60

Originalserum; Agg. titer = 1:20,000 Abgüsse = 1:5,000 Bind. Quot. = 3:4

der Isolierungsquotient mit der Temperaturerhöhung gestiegen. Bei diesem Fall ist auch das Wassermedium am besten. Bei 60°C zeigt das isolierte Agglutinin im ersten Medium 1:500, im zweiten 1:1,000, im letzten 1:500 vom Agglutinintiter. Das Agglutinin, das in das Wassermedium übergeht, verminderte sich gegenüber dem letzten Versuch, mehrte sich aber im hypotonischen und isotonischen Medium. Hinsichtlich des Isolierungsquotienten ist bei 60°C das hypotonische Medium am besten, wie schon in Versuch 1) konstatiert worden war. Bei 65°C zeigt das isolierte Agglutinin im ersten Medium 1:1,000, im zweiten und letzten 1:500. Bei 65°C hat das isotonische Kochsalzmedium einen besseren Isolierungsquotienten. Bei 70°C: isoliertes Agglutinin im ersten Medium 1:500, im zweiten und dritten 1:250 vom Agglutinintiter. Da in dieser Weise das isolierte Agglutinin herabgesetzt ist, hat im allgemeinen doch das Kochsalzmedium den besseren Isolierungsquotienten.

Wie aus diesen Versuchen zu ersehen ist, erhielt ich bei der Isolierung des Agglutinins die gleichen Resultate wie bei der Isolierung des Präzipitins.

Versuch 3). Die zur Isolierung des Bakterienagglutinins nötige Zeitdauer.

Bei den Versuchen Exp. 2) untersuchte ich genauer die für die Isolierung des Präzipitins nötige Zeitdauer, indem ich zweierlei Medien verwandte. Nun habe ich mit 10%iger Rohrzuckerlösung unter der gleichen Vermutung die folgenden Untersuchungen ausgeführt. Das erste Medium ist 0.034%ige Kochsalzrohrzuckerlösung, das zweite Medium ist anfangs nur 10%ige Rohrzuckerlösung, welcher nach 15 Minuten langer Digerierung Stückchen Kochsalzkristallen bis zu einer 0.034%igen Kochsalzrohrzuckerlösung hinzugefügt werden. Dann wird die Manipulation noch weiter 15 Minuten lang fortgesetzt.

Tabelle 9 a.
Einfluß d. Zeitdauer und Beziehung zwischen Wasser
u. Rohrzucker.

Temp.	Med.	Isolierte Agglutinine							Bind. Quot.	Isolier. Quot.
		1: 50	1: 100	1: 200	1: 400	1: 800	1: 1,600	1: 3,200		
45°	I	+	+	+	-	-	-	-	3:4	1:96
	II	+	+	+	+	-	-	-		„
55°	I	+	+	+	+	+	-	-	„	1:24
	II	+	+	+	+	+	+	-	„	1:12
60°	I	+	+	+	+	+	+	-	„	1:12
	II	+	+	+	+	+	+	-	„	1:12
65°	I	+	+	+	+	+	-	-	„	1:24
	II	+	+	+	+	+	-	-	„	1:24
70°	I	+	+	+	+	+	-	-	„	1:24
	II	+	+	+	+	+	-	-	„	1:24

Originalserum. Agg. titer = 1:25,600 Abgüsse = 1:6,400

Die Resultate dieser Versuchsserie können durch Tabelle 9 veranschaulicht werden. Wir sehen das isolierte Agglutinin im ersten Medium bei 45°C 1:200, im zweiten 1:400; bei 55°C im ersten 1:800, im zweiten 1:1,600; bei 60°C im ersten 1:1,600, im zweiten 1:1,600; bei 65°C im ersten 1:800, im zweiten 1:800; bei 70°C im ersten 1:800, im zweiten 1:800. Also bei 45°C und 55°C hat das zweite Medium bessere Isolierungsquotienten als das erste. Bei 60°C zeigen beide Medien gleiche Resultate. Bei 65°C und 70°C ist das isolierte Agglutinin geringer als bei 60°C, doch ist seine Menge in beiden Medien fast gleich. Der Unterschied im isolierten Agglutinin bei den beiden Medien könnte auf die erste Zeithälfte der Digerierung zurückzuführen sein. Die meisten Antikörper dürften wohl in der ersten Hälfte der Zeit in die Lösungen übergegangen sein. Das Rohrzuckermedium hat bei 45°C und 55°C einen überragenden Einfluß, doch bei darüber erhöhter Erwärmung zeigt es keine besondere Wirkung. Die gleichen Beziehungen sieht man in Tabelle 6). In jedem Fall untersuchte ich mittels Wassermediums statt mit Rohrzuckermedium. So kam ich zu der nächsten Untersuchung.

Wie aus der Tabelle 10b) ersichtlich ist, wurde zwischen Rohrzucker- und Wassermedium kein besonderer Unterschied beobachtet. *Sunouchi*⁵²⁾ erzielte fast die gleichen Resultate bei der Isolierung

des Bakterienagglutinins mittels Rohrzucker- und Wassermediums. *Takeshita*⁵⁵⁾ fand auch bei der Isolierung des Bakterienagglutinins keine Über- oder Unterlegenheit vom Rohrzucker- oder vom Wassermedium.

Tabelle 9 b.

Temp.	Med.	Isolierte Agglutinine						Bind. Quot.	Isolier. Quot.	
		1: 50	1: 100	1: 200	1: 400	1: 800	1: 1,600			1: 3,200
45°	Aq. dest.	+	+	+	-	-	-	-	7:8	1: 56
	Rohrzucker	+	+	±	-	-	-	-	„	1: 56
55°	Aq. dest.	+	+	+	+	+	-	-	„	1: 14
	Rohrzucker	+	+	+	+	+	-	-	„	1: 14
60°	Aq. dest.	+	+	+	+	-	-	-	„	1: 28
	Rohrzucker	+	+	+	+	-	-	-	„	1: 28
65°	Aq. dest.	+	+	±	-	-	-	-	„	1: 56
	Rohrzucker	+	+	+	-	-	-	-	„	1: 56
70°	Aq. dest.	+	±	-	-	-	-	-	„	1: 112
	Rohrzucker	+	+	-	-	-	-	-	„	1: 112

Originalserum; Agg.-titer = 1:12,800 Abgüsse = 1:1,600

Versuch 4). Isolierung der Immuns substanz aus dem erhitzten Bakterienantikörperkomplex (Agglutinat).

Der Einfluß gewisser Schädigungswirkungen, wie erhöhter Temperaturen, Alkalien, Säuren u.s.w., auf das Agglutinationsphänomen wurde bereits vor mehreren Jahren eingehend studiert.

*Porges*⁴⁸⁾ fand, daß die Erhitzung auf 70°C bis 80°C Typhusbazillen und eine Reihe anderer Bakterienarten in ihrer Agglutinabilität stark schädigt, daß aber die Agglutinabilität dieser gleichen Bakterien, wenn sie längere Zeit auf 100°C erhitzt werden, wiederum stark erhöht wird. *Dreyer*⁶⁷⁾ bestätigte diesen Befund. *Porges*⁴⁸⁾ sieht die Ursache für dieses Phänomen in einer verschiedenen Beeinflussung des Proteins des Bakterienleibes. Bei der Erhitzung zwischen 70°C und 80°C wird das Protein so modifiziert, daß es die Stabilität der Suspension erhöht. *Jobling*¹⁹⁾ führte die Untersuchungen an Typhusbazillen und Bakterien der Cholera gruppe, Schweinepest, Paratyphus B. und Mäuse typhus, und zwar in Übereinstimmung mit *Porges*⁴⁸⁾ aus. *Eisenberg* und *Volk*⁸⁾ konstatierten die Tatsache, daß auf 62°C erhitzte Typhusbazillen nicht mehr agglutiniert werden. Sie unterschieden einen thermolabilen und einen thermostabilen Anteil; der thermolabile wird ungefähr bei 60°C zerstört, der thermostabile erhält sich mindestens bis 165°C unverändert.

Tabelle 10.
Isolierung des Bakterienagglutinins aus dem erhitzten
Bakterienantikörperkomplex.

Antigen	Native	60°	80°	80°	100°	100°	100°	100°	120°	150°									
		(1. St.)	(1. St.)	(2. St.)	(1. St.)	(2. St.)	(3. St.)	(4. St.)	(1. St.)	(1. St.)									
Abgüsse	1:1,000	1:1,000	1:3,000	1:3,000	1:3,000	1:1,000	1:6,000	1:6,000	1:7,000	1:9,000									
Iso. Agg.	500 1:	500 1:	750 1:	750 1:	1,000 1:	1,500 1:	500 1:	500 1:	250 1:	50 1:									
Bind. u. Isolier. Quot.	B	I	B	I	B	I	B	I	B	I	B	I							
	9:10	1:18	9:10	1:18	7:10	7:5:70	7:10	7:5:70	7:10	1:7	9:10	1:6	4:10	1:8	4:10	1:8	3:10	2.5:30	1:10

Originalserum; Agglutinintiter = 1:10,000

Hirschfeld¹⁶), Kraus²⁴), Pirquet⁶⁸), Buxton⁶⁹), Neisser und Shiga³⁹) etc. bestätigten diese Tatsache und betonten, daß unter gewissen Umständen ein Teil der Rezeptoren von der Zelle abgespalten wird, die als freie Rezeptoren ihre Bindungsfähigkeit für Agglutinin beibehalten. Die Abspaltung geht am reichlichsten bei erhöhter Temperatur vor sich. Nur wenn wir die Bakterien auf 70°C–90°C erhitzen, gehen die Rezeptoren in gesteigertem Maße in die Lösung über, und indem sie die Agglutinine binden, bewirken sie das Fehlen der Reaktion. Bei längerem Erhitzen auf 100°C werden aber die freien Rezeptoren zerstört. Joos²⁰) wies nach, daß die lebenden Typhusbazillen zwei verschiedene agglutinierbare Substanzen enthalten, welche sich durch ihre Empfindlichkeit der Wärme gegenüber voneinander unterscheiden. Die erste, das α -Agglutinogen, wird bei 60°C–62°C rasch zerstört. Die zweite Substanz, das β -Agglutinogen, findet sich ebenfalls in den normalen Typhusbazillen vor. Werden Typhusbazillen auf 60°C–62°C erwärmt, so bleibt das β -Agglutinogen unverändert, während das α -Agglutinogen zerstört wird. Nakamoto⁴⁰) bemerkte nach genauerer Untersuchung, daß Typhusbazillen durch einstündige Erhitzung auf 60°C keine Veränderung im Vergleich zu nativen erfahren, daß aber auf 62°C erhitze Bazillen unvollkommen agglutinierbar werden. Die Agglutinierbarkeit wurde bei Erhitzung auf 80°C–85°C am stärksten geschwächt, bei über 90°C wird sie wieder stärker und deutlicher. Auf 100°C 3 Stunden lang erhitze Bazillen stellen die Agglutinierbarkeit wieder her und nach 5 stündiger Erhitzung bei 100°C vergeht diese wieder.

Als Ursache hierfür gibt er an, daß beim Agglutinogen 2 Teile, ein thermolabiler und ein thermostabiler, unterschieden werden können. Der erste verändert sich durch Erhitzung zu einer schleimigen Masse und wirkt als Schutzkolloid für den zweiten. Aber durch Erhitzung auf 100°C verliert er diese kolloidale Schutzwirkung. Haku¹⁴) bemerkte, daß Kolibazillen die Agglutinationsfähigkeit durch Erhitzung auf über 75°C teilweise einbüßen, sie aber bei 2 Stunden langer Erhitzung auf 100°C wiedererlangen. Diese Reaktivität der Agglutininität vermindert sich bei einer länger als 2 Stunden dauernden Koktion.

Ich untersuchte die Isolierung des Agglutinins aus dem Agglutinat, welches sich in einer Mischung von erhitzten Kolibazillen und Antikolibazillenimmenserum bildete. Für Isolierungszwecke benutzte ich das hypotonische Medium und die Wärmeapplikation bei 60°C.

Kolibazillenemulsion, je 2 cc, wird von 60°C auf 120°C erhitzt. Nach der Erhitzung wurde das Volumen bis zum ursprünglichen wiederhergestellt, um die Absorbierbarkeit des Immunerums an jedem erhitzten Antigen genauer festzustellen, da sonst Flüssigkeit verdampfen könnte und übriggebliebenes Immunerum im Abguß infolge der Volumenveränderung nicht genau vergleichbar wäre. Zwei cc von derartigem Antigen wurden mit 2 cc Immunerum vom Agglutinintiter 1:10,000 gemischt. Die Titer der Abgüsse wurden auf Originalserumvolumen berechnet. Die Differenz zwischen der ursprünglich zugegebenen und der restlichen Agglutininmenge gab uns die absolute Menge des absorbierten Agglutinins, das Verhältnis der absorbierten Menge zur zugegebenen den relativen Grad der Absorption an, den wir als Bindungsquotienten bezeichnen werden.

Aus der Tabelle geht hervor, daß native und auf 60°C erhitzte Bazillen eine gleiche Menge von Agglutinin, d.h. 9:10 absorbieren, daß aber bei höherer Erhitzung, wie bei 80°C (1 Stunde), 80°C (2 Stunden) 100°C (1 Stunde), die Bazillen weniger Agglutinin absorbieren können d.h. 7:10. Wenn aber die Kolibazillen bei 100°C 2 Stunden lang erhitzt werden, so wird ihre Absorptionsfähigkeit bis zu der von nativen oder auf 60°C erhitzten Bazillen, d.h. 9:10, wieder hergestellt und es zeigt sich zwischen ihnen kein Unterschied.

Aber wenn man noch weiter darüber hinaus erhitzt, so z. B. bei 100°C (3 St), 100°C (4 St), 120°C (1 St), wird ihre Absorptionskraft deutlich abgeschwächt, 4:10 - 1:10. Schiller⁷⁰⁾ fand, daß bis zu 100°C erhitzte Typhusbazillen eine größere Menge des Agglutinins absorbieren als unerhitzte. Kubota⁷¹⁾ bemerkte, daß bei der partiellen Absorption lebende und auf 60°C erhitzte Bakterien die größte Menge des Agglutinins absorbieren. Die auf über 65°C erhitzten Bakterien können daraus aber nur wenig Agglutinin absorbieren. Wenn die Typhusbazillen auf 60°C oder 100°C je 30, 60 oder 120 Minuten lang erhitzt werden, so zeigen sie keine Veränderung in ihrer Absorptionsfähigkeit.

Aus allen den oben angeführten und vielen berichteten Versuchen werden wir uns zunächst im allgemeinen darüber klar, daß einerseits die Agglutinierbarkeit, andererseits die Absorptionsfähigkeit der Bakterien durch Hitzeapplikation verschiedenartig beeinflusst wird, d.h. native und bis auf 60°C erhitzte Bazillen absorbieren eine große Menge Agglutinin, darüber hinaus erhitzte Bazillen absorbieren weniger Agglutinin, aber bei auf 100°C erhitzten Bazillen ist die

Absorptionskraft wieder gleich der bei nativen oder auf 60°C erhitzten Bazillen; noch darüber (über 100°C) hinaus erhitzte Bazillen verlieren in deutlicher Weise ihre Kraft.

Was die Isolierung des Immunkörpers aus dem Agglutinat von erhitzten Bazillen und dem Antikörperkomplex betrifft, so liegt sie anders als die Absorptionsbeziehung. Aus der Tabelle ersehen wir, daß bei den nativen und auf 60°C erhitzten Bazillen das isolierte Agglutinin 1 : 500, bei 80°C (1 St) - 80°C (2 St) 1 : 750, bei 100°C (1 St) 1 : 1,000, bei 100°C (2 St), 1 : 1,500 und bei den noch weiter erhitzten je 1 : 500, 1 : 500, 1 : 250, 1 : 50 vom Agglutinintiter betrug. Die nativen und erhitzten Bazillen machen eine geringere Menge von Immunsustanzen los, wenn sie eine größere absorbiert haben. Die bei 80°C - 100°C (1 St) erhitzten, welche eine geringere Menge absorbiert haben, geben eine etwas größere Menge frei. Aus den bei 100°C (2 St) erhitzten Bazillen wird die größere Menge abgetrennt und aus den darüber hinaus erhitzten Bazillen weniger. Das könnte auf den Affinitätsunterschied zurückgeführt werden und darauf, daß durch Hitzewirkung die Affinität von Antigen zum Immunkörper schwächer geworden sein könnte.

Die nativen und auf 60°C erhitzten Bazillen geben wegen stärkerer Affinität zur Immunsustanz trotz ihrer großen Absorption des Immunkörpers, weniger Immunsustanz los. Dagegen lassen bei 60°C (1 St.) erhitzte viele Immunkörper los, wenn sie auch weniger Immunkörper besessen hatten. Die bei 100°C (2 St.) erhitzten Bazillen machen die meisten Immunkörper wegen ihrer größeren Absorbierbarkeit mit schwächerer Affinität frei. Aus den darüber hinaus erhitzten wird eine geringere Menge getrennt, weil sie trotz ihrer geringeren Affinität weniger absorbiert haben.

Versuch 5). Isolierung des Bakterienpräzipitins.

Was die Isolierung des Bakterienpräzipitins betrifft, so ist diese noch nicht viel untersucht worden. *Checkering*⁷⁾ isolierte eine protektische Substanz aus dem Präzipitin von Pneumokokkenextrakt und Antipneumokokkenimmenserum. Über die Isolierung des Bakterienpräzipitins von Kaninchen wurden von *Haku*¹⁴⁾ zuerst genauere Untersuchungen angestellt.

Als Antigen benutzte ich Kolifiltrat. Das Filtrat wurde folgendermaßen behandelt: eintägige Agarkultur wurde in destilliertem Wasser aufgeschwemmt, eine Stunde lang bei 60°C erhitzt, zwei Tage bei 37°C gehalten und dann durch *Berkefeld*-Kerze filtriert. Vor dem Versuch wurde Kochsalz bis zu einem Gehalt von 0.85% zugesetzt. Je 2 cc von Kolifiltrat wurden von 60°C bis 120°C (1 St.) erhitzt. Nach

dem Ende der Erhitzung wurde das Ursprungsvolumen mit Kochsalzlösung wieder hergestellt, um die ungebunden gebliebenen Antikörper genau zu bestimmen, wie es im Versuch 4) geschildert worden war. Die Isolierung wurde mit hypotonischem Medium ausgeführt, wobei eine Wärme von 60°C appliziert wurde. Originalserum, 1:400 vom Verdünnungstiter. Die Titer der Abgüsse wurde auf das originale Serumvolumen berechnet.

Tabelle 11.
Isolierung des Bakterienpräzipitins.

Antigen	Präzipitintiter (V.m.)			Bind. Quot.	Isolier. Quot.	Agg.
	Original	Abgüsse	Isol. P.			
Native	1:400	1:100	1:20	3:4	1:15	1:2,000
60° (1. St.)	"	1:100	1:20	3:4	1:15	1:2,000
80° (1. St.)	"	1:200	1:20	1:2	1:10	1:2,000
80° (2. St.)	"	1:200	1:20	1:2	1:10	1:2,000
100° (1. St.)	"	1:200	1:20	1:2	1:10	1:2,000
100° (2. St.)	"	1:200	1:20	1:2	1:10	1:1,000
100° (3. St.)	"	1:250	1:10	3:8	1:15	1: 500
120° (1. St.)	"	1:300	1: 5	1:4	1:20	1: 250

Aus der Tabelle ersehen wir, daß natives und auf 60°C erhitztes Kolifiltrat mehr Immunkörper absorbiert als auf 80°C (1 St.) - 100°C (2 St.) und auf noch mehr als 100°C (3 St.) und 120°C erhitztes Antigen. Es kam nun darauf an zu zeigen, daß, je höher das Bakterienfiltrat erhitzt wird, es desto weniger Immuns substanz absorbiert.

Winterberg⁵⁸⁾ fand, daß nach Erwärmung keimfreier Typhus-Bouillon-Filtrate, die, ohne daß eine solche vorausgegangen wäre, stets typische, spezifische Niederschläge bildeten, diese ganz regelmäßig gar nicht oder nur sehr zweifelhaft auftreten, wenn die Erhitzung im kochenden Wasser auch nur 20 bis 35 Minuten gedauert hatte. Haku¹⁴⁾ fand nach der Präzipitinmethode der Antigen-Antikörperverdünnungsmethode, daß der Titer sich graduell mit der Hitzeeinwirkung auf das Antigen (Kolifiltrat) vermindert, obwohl sich nach der Uhlenhuthschen Präzipitinmethode der Titer durch 2-stündige Erhitzung auf 100°C steigert.

Isoliertes Präzipitin aus nativem und auf 60°C erhitztem Kolifiltrat: 1:20 und bei 80°C (1 St.) - 100°C (2 St.) auch 1:20 vom Präzipitintiter. Aus bei 100°C (3 St.) und 120°C (1 St.) erhitzten Bazillen 1:10 und 1:5. Der Isolierungsquotient ist anders; je höhere Hitze auf das Kolifiltrat einwirkt, desto relativ mehr Immunkörper

sind aus dem Präzipitin trennbar. Aber noch höher erhitzte Bazillen machen wenig Präzipitin frei, was ich auf geringere Absorbierbarkeit zurückführen möchte. Es ist wahrscheinlich, daß je mehr Hitze auf das Filtrat wirkt, desto geringer die Affinität des Antigens zum Antikörper wird.

Ich prüfte die Agglutination des Kolibazillenleibes mit diesem isolierten Bakterienpräzipitin. Die Agglutination geht parallel mit der Präzipitation, d.h. der Agglutinationstiter hängt von dem Titer des isolierten Präzipitins ab. *Haku*¹⁴⁾ und *Toma*⁵⁶⁾ bewiesen mit isoliertem Präzipitin, daß Präzipitin und Agglutinin aus identischen Kräften bestehen.

Experiment 4. Isolierung des Hämolysins.

Die Trennung des Immunchämolysins aus einem spezifischen Niederschlag wurde zuerst von *Lieberman* und *Fenyvessy*²⁸⁾ und darauf von *Pietro Rondoni*⁴⁴⁾ ausgeführt. *Kosakai*²¹⁾ sind mit Rohrzuckermedium gute Erfolge beschieden gewesen.

Tabelle 12.
Isolierung des Hämolysins.

Medium (NaCl)	45°		55°		60°		65°		70°	
	I. Hä.	I. Q.	I. Hä.	I. Q.	I. Hä.	I. Q.	I. Hä.	I. Q.	I. Hä.	I. Q.
0.85 %	1 : 50	1 : 50	1 : 50	1 : 50	1 : 100	1 : 25	1 : 200	1 : 12.5	1 : 100	1 : 25
0.034 %	1 : 50	1 : 50	1 : 100	1 : 25	1 : 200	1 : 12.5	1 : 100	1 : 25	1 : 50	1 : 50
Aq. dest.	1 : 100	1 : 25	1 : 200	1 : 12.5	1 : 100	1 : 25	1 : 100	1 : 25	1 : 50	1 : 50

Originalserum T = 1 : 5,000 Abgüsse = 1 : 2,500 B.Q. = 1 : 2

Als Antigen benutzte ich das Stroma, da das rote Blutkörperchen selbst bei höheren Temperaturen aufgelöst wird. Das defibrierte rote Blutkörperchen von Ziegen wurde mit destilliertem Wasser aufgelöst und mehrmals mit physiologischer Kochsalzlösung gewaschen; dann erhielt man das weiße Stroma. Zwei cc von Ziegen-Stromaemulsion welche aus 3 cc Blutkörperchen gewonnen waren, wurden mit 2 cc von Antiziegen-roteblutkörperchen-Serum vom Hämolysintiter 1 : 5000 gemischt. Zwei Stunden lang wurde das Gemisch bei 37°C gehalten, dann wurde der Bodensatz 3-mal gewaschen und dann im Isoliermedium behandelt.

Wir können auch beweisen, daß das hypotonische Medium (0.034%) bei einer Wärmeapplikation von 60°C für die Isolierung des Hämolysins ebenfalls günstiger ist als andere Medien.

Experiment 5. Isolierung des Hämoagglutinins.

Die hierher gehörigen Versuche haben schon *Landsteiner* und *Jagic*²⁷⁾ sowie *Lieberman* u. *v. Fenyvessy*²⁸⁾ mit mehr oder weniger Erfolg vorgenommen. Weiter hat *Furuhata*¹²⁾ mit Rohrzuckermedium gute Erfolge erzielt.

Tabelle 13.
Isolierung des Hämoagglutinins.

Medium (NaCl)	45°		55°		60°		65°		70°	
	Iso. H.ag.	I. Q.	Iso. H.ag.	I. Q.	Iso. H.ag.	I. Q.	Iso. H.ag.	I. Q.	Iso. H.ag.	I. Q.
0.85 %	1 : 100	1 : 50	1 : 100	1 : 50	1 : 200	1 : 25	1 : 400	1 : 12.5	1 : 200	1 : 25
0.034 %	1 : 100	1 : 50	1 : 200	1 : 25	1 : 400	1 : 12.5	1 : 400	1 : 12.5	1 : 100	1 : 50
Aq. dest.	1 : 200	1 : 25	1 : 400	1 : 12.5	1 : 200	1 : 25	1 : 200	1 : 25	1 : 100	1 : 50

Originalserum T = 1 : 10,000 Abgüsse = 1 : 5,000 B.Q. = 1 : 2

Als Antigen benutzte ich Stroma von Hühnerblutzellen. Zwei cc Immuns Serum wurden mit 2 cc Stromaemulsion gemischt, welche aus 1 cc Hühnerblutzellen hergestellt war. Die Manipulation wurde wie bei der Isolierung des Hämolysins ausgeführt.

Die Resultate dieser Versuchsserie werden durch die Tabelle veranschaulicht, welche zeigt, daß das hypotonische Medium auch für die Isolierung des Hämoagglutinins bei Wärmeapplikation von 60°C den besten Erfolg hat.

Experiment 6.

Nunmehr will ich mich der Isolierung des Präzipitins aus spezifischem Niederschlag mittels verschiedener Elektrolyte beschäftigen und den Einfluß der Elektrolyte auf dieses Problem untersuchen. Ich wählte die Salze: NaCl, KCl, K₂SO₄, MgSO₄, Na₂HPO₄, Na₂C₂O₄, K₄Fe(CN)₆ aus der Tabelle von *Pincussohn*⁶²⁾.

Tabelle 14.
Mit Blut isotonische Lösung.

Salze	Mol. gew.	Proz-Gehalt	g-Mol. in Liter
Chlornatrium (NaCl)	58.5	0.85	0.143
Chlorkalium (KCl)	74.5	1.10	0.149
Kaliumsulfat (K ₂ SO ₄)	174.0	1.90	0.110
Magnesiumsulfat. (MgSO ₄)	246.0	5.50	0.236
Natriumphosphat (Na ₂ HPO ₄)	246.0	2.00	0.143
Natriumoxalat (Na ₂ C ₂ O ₄)	134.0	1.34	0.100
Ferrocyanalkalium (K ₄ Fe(CN) ₆)	422.4	4.45	0.110

Versuch 1). Isolierung des Präzipitins mit verschiedenen Salzmedien (isotonische Lösung bei 65°C).

In diesem Versuch habe ich aus dem Präzipitat, welches durch Antigen-Antikörper in physiologischem Kochsalzmedium, wie gewöhnlich, gebildet wurde, in verschiedenen Salzmedien von isotonischer Lösung bei 65°C das Präzipitin wieder frei gelassen. Die Titerbestimmung der isolierten Lösung wurde darauf in physiologischem Kochsalzmedium nach der Verdünnungsmethode ausgeführt.

Aus der Tabelle ersehen wir die interessante Tatsache, daß in den Medien $MgSO_4$, Na_2HPO_4 , $K_4Fe(CN)_6$ das isolierte Präzipitin 1:100 zeigt, obgleich es in KCl , K_2SO_4 , $Na_2C_2O_4$, 1:50 ist und in derselben Weise wie in $NaCl$ übergeht. Daher beträgt das isolierte Präzipitin in jenen Medien etwa das Doppelte wie in den letzteren.

Tabelle 15.
Isolierung des Präzipitins bei 55°C.

Med. (Isotonisch)	Isoliertes Präzipitin (V.m.)						Bind. Quot.	Isolier. Quot.	
	1:5	1:10	1:25	1:50	1:100	1:200			
$NaCl$	+	+	+	+	—	—	1:2	1:10	
KCl	+	+	+	+	—	—	"	1:10	
K_2SO_4	+	+	+	+	—	—	"	1:10	
$MgSO_4$	+	+	+	+	+	—	"	1:5	
Na_2HPO_4	+	+	+	+	+	—	"	1:5	
$Na_2C_2O_4$	+	+	+	+	—	—	"	1:10	
$K_4Fe(CN)_6$	+	+	+	+	+	—	"	1:5	
Originalserum	V.T. = 1:1,000		B.Z. = 1:250		Abgüsse = 1:500				

Versuch 2).

Da bei dem Versuch Spuren von verschiedenen Salzen zum Isoliermedium hinzugefügt werden, so ist es nötig, den Einfluß der verschiedenen Salze auf die Präzipitinreaktion zu berücksichtigen. Hier wurde das Immunserum von V.T.=1:1,000, B.Z.=1:500 verwandt. Anfangs wurde das Originalserum mit verschiedenen isotonischen Salz auf 1:10 verdünnt, dann, wie gewöhnlich, mit 1%iger Gummi-kochsalzlösung verdünnt und der Präzipitintiter nach der Verdünnungsmethode bestimmt. Ich habe auch mittels isolierten Präzipitins in gleicher Weise die Prüfung vorgenommen. Das isolierte Präzipitin, welches im Kochsalzmedium isoliert wurde, wurde mit verschiedenen isotonischen Salzlösungen auf 1:2 verdünnt, worauf in derselben Weise wie vorher in der Kochsalzlösung der Titer bestimmt wurde.

Tabelle 16 a.
Effekt von Salzspuren auf die Präzipitinreaktion.

Salze	Präzipitintiter (Vm.)							
	1:10	1:25	1:50	1:100	1:250	1:500	1:1,000	1:2,000
NaCl	+	+	+	+	+	+	+	—
KCl	+	+	+	+	+	+	+	—
K ₂ SO ₄	+	+	+	+	+	+	+	—
MgSO ₄	+	+	+	+	+	+	+	—
Na ₂ HPO ₄	+	+	+	+	+	+	+	—
Na ₂ C ₂ O ₄	+	+	+	+	+	+	+	—
K ₄ Fe(CN) ₆	+	+	+	+	+	+	+	—

Originalserum V.T. = 1:1,000 B.Z. = 1:500

Tabelle 16 b.

Salze	Präzipitintiter						
	1:2	1:5	1:10	1:25	1:50	1:100	1:200
NaCl	+	+	+	+	+	—	—
KCl	+	+	+	+	+	—	—
K ₂ SO ₄	+	+	+	+	+	—	—
MgSO ₄	+	+	+	+	+	—	—
Na ₂ HPO ₄	+	+	+	+	+	—	—
Na ₂ C ₂ O ₄	+	+	+	+	+	—	—
K ₄ Fe(CN) ₆	+	+	+	+	+	—	—

Originalserum V.T. = 1:1,000 B.Z. = 1:500

Hier sind keine nennenswerten Unterschiede zwischen den einzelnen Präzipitintitern bemerkbar. So kommt es sachlich nur darauf an, den Einfluß der Spuren der verschiedenen Salze auf die Präzipitinreaktion, durch den die Endresultate der isolierten Präzipitintiter voneinander abweichen würden, auszuschalten.

Versuch 3). Isolierung bei 60°C.

Bei diesem Versuch wurde die Isolierung mittels verschiedener Salzmedien, vom isotonischen bis zu Aq. dest. stufenweise verdünnt, bei 60°C ausgeführt. Bei 60°C haben alle hypotonischen Salzmedien bessere Resultate als isotonische oder Wassermedien aufzuweisen. Medien von MgSO₄, Na₂HPO₄, K₄Fe(CN)₆ haben bessere Resultate als NaCl, KCl, Na₂C₂O₄ und K₂SO₄.

Tabelle 17.
Isolierung des Präzipitins bei 60°C.

Medium (1:25)	Isoliertes Präzipitin					Bind. Quot.	Isolier. Quot.	Antigen- gehalt	N-Menge
	1:5	1:10	1:25	1:50	1:100				
NaCl	+	+	+	—	—	1:2	1:10	20:100,000	0.035
KCl	+	+	+	—	—	„	1:10	20:100,000	0.0385
K ₂ SO ₄	+	+	+	—	—	„	1:10	20:100,000	
MgSO ₄	+	+	+	+	—	„	1:5	20:100,000	0.035
Na ₂ HPO ₄	+	+	+	+	—	„	1:5	20:100,000	0.0315
Na ₂ C ₂ O ₄	+	+	+	±	—	„	1:10	20:100,000	0.042
K ₄ Fe(CN) ₆	+	+	+	+	—	„	1:5	20:100,000	0.049

Originalserum V.T. = 1:500 B.Z. = 1:500 Abgüsse = 1:250 N. = 1.0325

Versuch 4). Isolierung des Präzipitins aus dem Präzipitat, welches sich im MgSO₄-Medium bildete.

Bei diesem Versuch habe ich aus dem Präzipitat, welches sich im MgSO₄-Medium bildete, mit verschiedenen hypotonischen Salzlösungen (1:25 von isotonomischer Lösung) bei 60°C die Immuns substanz isoliert. Auch hier ist das gleiche Verhältnis wie im vorigen Versuch bemerkbar. MgSO₄, Na₂HPO₄ u. K₄Fe(CN)₆ haben bessere Resultate als NaCl, KCl, u. a.

Tabelle 18.

Medium (1:25)	Isoliertes Präzipitin				
	1:5	1:10	1:25	1:50	1:100
NaCl	+	+	+	—	—
MgSO ₄	+	+	+	+	—
Na ₂ HPO ₄	+	+	+	+	—
KFe ₄ (CN) ₆	+	+	+	+	—

Originalserum V.T. = 1:500 B.Z. = 1:500 Abgüsse = 1:250

So könnten wir annehmen, daß die Verbindung des Antigens und Antikörpers im MgSO₄ und NaCl-Medium dieselbe ist und das Präzipitat nirgends einen Einfluß auf den Isolierungseffekt ausübt, wenn die Verbindungsmedien verschieden sind. Doch der Isolierungseffekt ist je nach den Salzarten verschieden.

Aus dem Versuch möchten wir schließen, daß, da NaCl, KCl, K₂SO₄, Na₂C₂O₄ einwertige Salze und MgSO₄, K₄Fe(CN)₆ zweiwertige Salze sind, das zweiwertige Salz, besonders die Kation, einen besseren Isolierungseffekt haben muß.

Diskussion.

Was die Isolierung des Antikörpers anbetrifft, so bestehen viele komplizierte Zusammenhänge zwischen den Bedingungen, unter denen der Antikörper wieder befreit wird.

Aus obigen Versuchen kann man erkennen, daß die Bedingungen unter denen die Trennung des Antikörpers aus dem Antigen-antikörperkomplex mit guter Ausbeute gelingt, genau denen entsprechen, die bei der Bindung zwischen Antikörper und Antigen hemmend wirken. Vor allem sind also zu nennen: Temperaturerhöhung, Verschiebung des Mediums, in dem sich Antikörper und Antigen gebunden haben, nämlich Änderung des Elektrolytengehaltes; hypotonische Lösung, isotonische Lösung oder Nonelektrolytenmedium, Verschiebung der Wasserstoffionenkonzentration nach der alkalischen oder nach der sauren Seite. Durch geschickte Kombination dieser Faktoren kann man die Antikörper mit gutem Erfolg wiedergewinnen.

Das Medium, in dem die Digerierung ausgeführt wird, ist von ganz besonderer Wichtigkeit. In dieser Beziehung wurde bereits von vielen Autoren vorgearbeitet.

Hahn und Trommsdorff¹¹⁾ machten schwache Lauge oder Säure zum Gegenstand ihrer Untersuchungen, Lieberman und v. Fenyvessy²⁸⁾ N/100 Salzsäure, Israel Weinstein¹⁷⁾ schwache Lauge, Landsteiner²⁵⁾, Landsteiner und Jagic²⁷⁾ Kochsalzlösung Chickering⁷⁾ Natriumkarbonatlösung, Kosakai²¹⁾ und Furuhashi¹²⁾ Rohrzucker, Ogata⁴¹⁾ Rohrzucker unter Einwirkung von Natronlauge, Miwa⁶⁴⁾ destilliertes Wasser, Huntoon¹³⁾ destilliertes Wasser, Rohrzucker und physiologische Kochsalzlösung, Sunouchi⁵²⁾ physiologische Kochsalzlösung und Wassermedium, Kuwana²²⁾ hypertenisches Medium. In dieser Weise haben viele Autoren mit verschiedenen Medien mehr oder weniger gute Erfolge erzielt.

Ich beschäftigte mich nun mit der Isolierung des Immunkörpers aus dem spezifischen Niederschlag und habe dabei besonders die hypotonische Kochsalzlösung berücksichtigt, was bisher niemand getan hat.

Die Temperaturerhöhung ist auch bei diesem Problem ein maßgebender Faktor.

Was die Temperatur betrifft, so sind die Ansichten im allgemeinen nicht übereinstimmend. Nach Landsteiner²⁵⁾ geht bei Isolierung des Agglutinins die Menge des freigewordenen Antikörpers proportional mit der Temperatur des Mediums. Nach Israel Weinstein¹⁷⁾ ist zur Trennung des Agglutinins eine Temperatur von 37°C - 54°C erforderlich, doch soll kein größerer Unterschied durch die Temperatur bedingt werden. Pietro Rondoni⁴⁴⁾ behauptet, daß bei Isolierung des Hämolytins der Quotient der Isolierung nicht parallel mit der Temperatur laufe, und meint, daß für die Isolierung in alkalischem Medium eine Temperatur von 0°C und 37°C gleich wirke. Nach Kosakai²¹⁾ ist die Trennung bei Hämolytins desto stärker, je höhere Temperaturen verwendet werden. Nach Ogata⁴¹⁾ sind die besten Erfolge bei 42°C - 45°C zu

erwarten und zwar mit schwach alkalischer Lösung. Auch *Furuhata*¹²⁾ gibt bei Hämagoagglutinin gleiche Resultate an. Nach *Sunouchi*⁵²⁾ eignet sich eine Temperatur von 65°C für das Kochsalzmedium, eine solche von 55°C für destilliertes Wassermedium bei der Isolierung des Antikörpers am besten.

Diese Versuche veranschaulichen, daß die Isolierungsquotienten der Medien zu der Temperatur in enger Beziehung stehen. Die Menge der freigewordenen Antikörper geht proportional mit der Temperaturhöhe des Mediums, in dem die Digerierung ausgeführt wird, doch gibt es ein Maximum in der Temperatur, welches je nach den Medien verschieden ist. Für Wassermedium eignet sich eine Temperatur von 55°C und für Kochsalzlösung eine von 65°C, was mit den Resultaten von *Sunouchi* übereinstimmt.

Bei hypotonischem Kochsalzmedium, das wirklich eine 0.034%ige Kochsalzlösung darstellt, liegt der zweckmäßigste Effekt gerade bei einer Wärmeapplikation von 60°C. Nach *Asaba*²⁾ spielt das Kochsalz bei der Isolierung des Immunstoffes durch Mikroelektrodialyse eine große Rolle, dann es wird dabei immer eine Spur Kochsalz benötigt, doch wirkt eine große Menge Kochsalz umgekehrt hemmend auf die Isolierung. *Huntoon*¹³⁾ beschädigte sich mit hypotonischer Kochsalzlösung (0.21 %) für die Isolierung, allerdings nur bei der Sensibilisation.

Bezüglich des Überganges von Antigen in die isolierende Lösung hat schon *Kosaka*²¹⁾ bei der Hämolyseisolierung gewisse Feststellungen gemacht. Auch *Miwa*⁶⁴⁾ wies Bakterienprotein in dem isolierten Agglutinin nach. *Sunouchi*⁵²⁾, *Kuwana*²²⁾, *Haku*¹⁴⁾ und *Asaba*²⁾ fanden ebenfalls einen Antigenübergang in das isolierte Präzipitin. Ich beobachtete den Antigengehalt mittels der *Uhlenhuths*chen Methode mit bekannten Immunsera. Aus meiner Untersuchung ist ersichtlich, daß das Antigen immer in die isolierende Lösung übergeht. Das Antigen geht proportional mit der Temperaturhöhe, und zwar beträgt es stets mehr im Wassermedium als im hypotonischen und Kochsalzmedium.

Man hat verschiedene Versuche zur Isolierung des im Immunsrum enthaltenen Immunkörpers angestellt, um das übrigbleibende Eiweiß im Serum zu beseitigen. Ich habe die Stickstoffmenge in der isolierenden Lösung nach Mikrokjeldahlscher Methode bestimmt. Wie aus dem Versuch zu ersehen ist, läuft die Stickstoffmenge nicht parallel mit dem Isolierungsquotienten, sondern es findet sich oft bei geringerem Eiweißgehalt ein höherer Präzipitintiter in der isolierenden Lösung. Stickstoffmenge und Antigengehalt gehen parallel mit der Temperaturhöhe; im Wassermedium sind sie immer größer als in hypotonischer und isotonischer Kochsalzlösung.

Vom Isolierungsquotienten aus gesehen, besagen Eiweiß- und Antigengehalt, daß das hypotonische Medium (0.034 %) einen besseren Effekt hat als andere Medien, und zwar gerade bei einer Wärmeapplikation von 60°C. *Kosaka*²¹⁾ teilte mit, daß sich innerhalb von vier Stunden kein Unterschied für die Isolierung des Hämolyse zeigt. *Furuhata*¹²⁾ konnte bei 1/2 - 4 Stunden langer Digerierung keine Unterschiede

nachweisen und erklärte eine halbe Stunde als genügend für die Isolierung. Auch *Ogata*⁴¹⁾ untersuchte den Einfluß der Zeitdauer und hielt eine halbe Stunde für ausreichend zur Digerierung. *Sunouchi*⁵²⁾ fand keine Unterschiede für die Isolierung des Präzipitins bei mehr als einer viertel Stunde.

Die Untersuchungen an 0.034 %iger Kochsalzlösung und die an einem anfänglichen Wassermedium, in welches nach 15 minütiger Digerierung Kochsalzkristalle bis zu 0.034 % Gehalt hinzugefügt werden, lehren uns, daß bei 45°C und 55°C die isolierte Präzipitinmenge im zweiten Medium größer ist als im ersten und sich bei über 60°C keine bemerkbaren Unterschiede mehr finden. Daher kann sich wohl der größte Teil der isolierten Antikörper in der ersten viertel Stunde aus dem Präzipitat trennen.

Die Verbindung des Antigens mit dem Antikörper erfolgt in der Regel sehr rasch, sie ist nach *Eisenberg* und *Volk*⁵⁾ sowie nach *Arrhenius*³⁾ nach 5 Minuten beendet. Wir sehen gewöhnlich diese Verbindung bei der Präzipitationsreaktion, besonders wenn hochwertiges Serum vom Verdünnungstiter, wie in diesem Versuch, gebraucht wird, viel rascher auftreten. Nach Mischen der beiden Reagenzien kann man schon nach einigen Minuten das Entstehen der Trübung und der Niederschläge beobachten, sonst ist aber im Aussehen der Niederschläge kein Unterschied zu bemerken.

Es ist wohl wahrscheinlich, daß, wenn die Reaktion, wie eben besprochen, viel rascher auftritt, auch die Trennung von Antigen und Antikörper rascher erfolgen würden. *Kosakai*²¹⁾ benutzte als erster das Rohrzuckermedium bei der Isolierung des Hämolytins und erklärte für die Isolierung im allgemeinen Nonelektrolyte als gut brauchbar. *Huntoon*¹³⁾ gebrauchte in der Annahme, daß sich Nonelektrolytmedien ebenso wie Rohrzucker verhalten, das Wassermedium bei der Isolierung des Bakterienagglutinins und erzielte die gleichen Resultate wie beim Rohrzuckermedium. *Sunouchi*⁵²⁾ und *Takeshita*⁵⁵⁾ erzielten fast gleiche Resultate bei der Isolierung des Bakterienagglutinins mittels Rohrzuckers und Wassermediums.

Ich bemerkte bei der Behandlung mit zweierlei hypotonischen Medien, daß sich das Rohrzuckermedium ebenso verhält wie das Wassermedium, und erhielt bei einem weiterem Vergleich mit Wasser und Rohrzucker das gleiche Resultat. *Kosakai*²¹⁾ betonte, daß man zur Isolierung das Rohrzuckermedium gebrauchen müsse. *Huntoon*¹³⁾ erklärte auch, daß das Kochsalzmedium auf die Isolierung hemmend wirke. Aber nach den zahlreichen Untersuchungen ist es nun nachgewiesen, daß auch salzhaltige Lösungen für diese Zwecke nicht nur zweckmäßig, sondern oft noch günstiger sind.

Der Einfluß gewisser schädigenden Wirkungen, wie erhöhter Temperaturen, Alkalien, Säuren u.s.w., auf das Agglutinationsphänomen wurde bereits vor mehreren Jahren eingehend studiert. Ich untersuchte die Isolierung des Agglutinins aus dem Agglutinat, welches sich in einer Mischung von erhitzten Kolibazillen und Immunkörpern bildete. Native und auf 60°C erhitzte Kolibazillen absorbieren eine größere Menge Agglutinin, darüber erhitzte absorbieren eine geringere Menge, aber bei 100°C (2 St.) erhitzte Bazillen stellen ihre Absorptionskraft wieder her und verhalten sich wie native oder bei 60°C erhitzte Bazillen, doch noch weiter (über 100°C) erhitzte

verlieren beinahe vollkommen ihre Kraft. Über eine Agglutinierbarkeitsänderung der Bazillen durch Hitze wurde im allgemeinen übereinstimmend schon von mehreren Autoren berichtet (*Porges*⁴⁸⁾ *Jobling*¹⁹⁾, *Eisenberg* und *Volk*⁸⁾, *Hirschfeld*¹⁶⁾, *Jooss*²⁰⁾ u.s.w.) und eine Absorbierbarkeitsveränderung ist von *Scheller*⁷⁰⁾ und *Kubota*⁷¹⁾ unter gleichen Verhältnissen nachgewiesen worden. Aus den Versuchen können wir auch beweisen, daß einerseits die Agglutinierbarkeit, andererseits die Absorptionsfähigkeit des Antikörpers von Bazillen bei Hitzeapplikation miteinander parallel gehen.

Bei der Isolierung des Immunkörpers aus dem Agglutinat von erhitzten Bazillen und dem Antikörperkomplex liegen jedoch die Verhältnisse anders als bei der Absorption. Die nativen und die bei 60°C erhitzten Bazillen geben eine geringere Menge von Immunsstoffen frei, wenn sie eine größere Menge absorbiert haben. Die bei 80°C - 100°C (1 St.) erhitzten Bazillen, welche eine geringere Menge absorbiert haben, geben eine etwas größere Menge frei. Von den bei 100°C (2 St.) erhitzten Bazillen wird der größte Teil getrennt, aus noch weiter und stärker erhitzten Bazillen ein kleinerer.

Diese Erscheinung möchte ich auf den Affinitätsunterschied zurückführen und darauf, daß durch die Hitzewirkung die Affinität des Antigens zum Immunkörper schwächer geworden ist.

Aus nativen und bei 60°C erhitzten Bazillen werden wegen stärkerer Affinität zur Immunsstoff, trotz ihrer starken Absorption von Immunkörpern, weniger Immunkörper getrennt. Bei 80°C - 100°C (1 St.) erhitze dagegen geben ziemlich viel frei, ungeachtet ihrer geringern Absorptionsfähigkeit. Die bei 100°C (2 St.) erhitzten Bazillen lassen den größten Teil der Immunsstoff los und zwar wegen ihrer größeren Absorbierbarkeit und schwächeren Affinität. Aus den noch weiter erhitzten Bazillen wird eine geringere Menge abgetrennt, weil sie trotz ihrer geringern Affinität weniger absorbiert haben. *Huntoon* behauptet, daß für die Isolierung des Bakterienagglutinins die auf 65°C erhitzten Bakterienantigene besser als unerhitzte oder noch weiter erhitze Bazillen wirkten. Durch unerhitzte Antigene werden viel mehr Immunkörper absorbiert als durch erhitze, aber gerade diese Affinität bietet eine größere Resistenz gegen Dissoziation. Wenn man Koktantigen benutzt, so ist die absorbierte Menge der Immunkörper geringer, doch tritt die Dissoziation schneller auf. Das auf 65°C erhitze Antigen absorbiert eine relativ große Menge von Immunkörpern und die Dissoziation geschieht relativ leicht.

Das stimmt in gewisser Hinsicht mit meinen Resultaten überein. Aber *Huntoon*¹³⁾ erhitze das Antigen bei 100°C nur 10 Minuten lang. Dieses dürfte sich jedoch anders verhalten als das bei 100°C 2 Stunden

lang erhitzte. *Winterberg*⁵⁸⁾ fand, daß nach Erwärmung keimfreier Typhus-Bouillon-Filtrate, die, ohne daß eine solche vorausgegangen wäre, stets typische spezifische Niederschläge bildeten, diese ganz regelmäßig gar nicht oder nur sehr zweifelhaft auftreten, wenn die Erhitzung im kochenden Wasser auch nur 20 bis 35 Minuten gedauert hatte. *Haku* bemerkte nach der Präzipitinmethode der Antigenantikörperverdünnungsmethode, daß der Titer sich graduell mit der Hitzewirkung auf das Kolifiltrat vermindert.

Ich isolierte Bakterienpräzipitin aus Präzipitat, welches sich in erhitztem Kolifiltrat und Immunkörpern bildete. Hier bemerkte ich, daß natives und bei 60°C erhitztes Kolifiltrat relativ mehr Antikörper als noch weiter erhitztes absorbiert, daß aber der Isolierungsquotient relativ kleiner ist als beim letzteren. Es ist wahrscheinlich, daß umso mehr Hitze auf das Filtrat wirkt, desto geringer die Affinität des Antigens zum Antikörper ist. Dabei habe ich auch die Agglutination der Kolibazillenleibes mit diesem isolierten Bakterienpräzipitin geprüft. Die Agglutination geht parallel mit der Präzipitation, d.h. der Agglutinintiter hängt von dem Titer der isolierten Präzipitinmenge ab.

*G. H. Wells*⁵⁹⁾ sagte: „Man hat allen Grund zu glauben, daß die Agglutination und die Präzipitation auf identischen Kräften beruhen, dieselben Prozesse darstellen und sich nur darin unterscheiden, daß sie mit besonderem Eiweißstoff (Zellen) bei der Agglutination und mit gelöstem Eiweiß bei der Präzipitation ausgeführt werden. Daher ist es wichtig, diese beiden Reaktionen zusammen zu betrachten, als wären sie grundsätzlich derselbe Prozeß, der sich nur in der Größe der kolloidalen Aggregate unterscheidet.“ *Haku*¹⁴⁾ und *Toma*⁵⁶⁾ bewiesen mit isoliertem Präzipitin, daß Präzipitin und Agglutinin aus identischen Kräften bestehen. Der gute Isolierungseffekt der hypotonischen Lösung bei 60°C gilt auch für die Isolierung des Hämolytins und Hämagoagglutinins.

*Eagle*⁶⁴⁾ erklärte, daß Maximalbindung, d.h. Minimaldissoziation beim Antigenantikörperkomplex am isoelektrischen Punkt des Serumglobulins liege. Daher ist, wenn er entfernt vom isoelektrischen Punkt liegt, die maximale Bindung erschwert und es erfolgt eine leichtere Dissoziation.

Besonders nach amerikanischen Autoren (vor allem *Shibley*⁷²⁾, *Eagle*⁶⁴⁾) spielen die Elektrolyte bei Antigenantikörperreaktion eine wichtige Rolle, d.h. sie rauben die oberflächliche Ladung des denaturierten Proteins bis zum isoelektrischen Punkt und führen eine sekundäre Flockulation herbei. Demgemäß dürften die Elektrolyte bei der Isolierung der Antikörper aus dem spezifischen Niederschlag, welcher an dem isoelektrischen Punkt ausfällt, dem Präzipitat die

Ladung erteilen, es vom isoelektrischen Punkte entfernen und sekundär die Reversibilität günstig beeinflussen.

Durch die obige Untersuchung ist bewiesen worden, daß Kochsalz (Elektrolyte) die Dissoziation nicht hemmt, wie *Kosakai*²¹⁾ oder *Huntoon*¹³⁾ behaupteten, sondern oft begünstigt. *Asaba*²²⁾ bemerkte ebenfalls bei Mikroelektrodialyse, daß Kochsalz eine große Rolle spielt und dabei eine Spur von Elektrolyten notwendig ist. Die Versuche lehren uns, daß zweiwertiges Ion enthaltendes Salz und H-haltige Salze einen etwas besseren Effekt auf die Reversibilität ausüben als einwertiges Ion enthaltende Salze. Das spezifische Präzipitat, welches sich im MgSO₄-Medium bildete, verhält sich für die Isolierung ebenso wie das im NaCl-Medium gebildete. Obwohl die spezifische Immunreaktion etwas anders ist als die Kolloidreaktion und bei der Isolierung nicht allein die Elektrolyte eine Rolle spielen, sondern es viele andere Faktoren dabei gibt, so dürften die Elektrolyte doch auch eine wesentliche Rolle spielen.

Auf Grund der angestellten Versuche neige ich zu der Annahme, daß zweiwertiges Ion- und H-Ion-enthaltende Salze, welche mehr Ladungskraft und größere Geschwindigkeit im elektrischen Feld haben als einwertige, den Antigenantikörperkomplex vom isoelektrischen Punkt in stärkerem Maße fernhalten als die letzteren und sekundär die Reversibilität begünstigen.

Zusammenfassung.

1. Es gibt bei der Isolierung des Antikörpers von sensibilisiertem Antigen je nach den Mediumarten einen wirksamsten Temperaturgrad.

a) Beim Wassermedium ist für dieses Problem eine Wärmeapplikation bei 55°C am zweckmäßigsten.

b) Bei hypotonischem Medium, und zwar bei einer 0.034%igen Kochsalzlösung, zeigt sich das beste Resultat gerade bei einer Wärmeapplikation von 60°C.

c) Die Temperatur von 65°C eignet sich für das Medium von physiologischer Kochsalzlösung. Unter geeigneten Bedingungen wird ein größerer Teil der Antikörper innerhalb einer viertel Stunde befreit.

2. Der bessere Isolierungseffekt des hypotonischen Mediums (0.034%) bei der Wärmeapplikation gilt für die Präzipitin-, Bakterienagglutinin-, Hämolyisin- und Hämooagglutininisolierung.

3. Aus folgenden Tatsachen kann man schließen, daß bei der

Isolierung des Antikörpers die Bindung zwischen Antigen und Antikörper stark hemmend wirkt:

a) Native, bei 60°C und bei 100°C (2 St.) erhitzte Kolibazillen absorbieren mehr Agglutinin als bei 80°C–100°C (1 St.) und über 100°C erhitzte.

b) Aus bei 100°C (2 St.) erhitztem Bazillenantikörperkomplex ist die größte Menge von Agglutinin trennbar. Je höher das Kolifiltrat erhitzt wird, desto weniger absorbiert es Immunkörper, läßt aber eine relativ große Menge wieder frei.

4. Zwischen Rohrzucker- und Wassermedium besteht kein großer Unterschied in Bezug auf die Isolierung des Antikörpers.

5. Es ist wahrscheinlich, daß auch Elektrolyte eine Rolle bei den Isolierungsvorgängen spielen, obwohl noch viele andere Faktoren mitsprechen, und daß zweiwertige Ionen darum leistungsfähiger sind als einwertige, weil zweiwertige Ionen enthaltende Salze einen besseren Isolierungseffekt zeigen als einwertige.

Zum Schluß möchte ich nicht verfehlen, Herrn Prof. Dr. M. Ogata für seine freundliche Anleitung und Anregung bei dieser Arbeit meinen herzlichsten Dank auszusprechen.

Literatur.

- ¹ Aronson, Berl. kl. Wochenschr. S. 625, 1893. — ² Asaba, Arbeiten a. d. Med. Fakult. Okayama Bd. 3, H. 4, S. 562, 1933. — ³ Arrhenius, Zeitschr. f. physik. Chem. Bd. 46, S. 415. — ⁴ Brieger u. Kravs, Berl. kl. Wochenschr. S. 30, 1907. — ⁵ Bechhold, Die Kolloid in Biologie und Medizin 1919 u. München. med. Wochenschr. S. 1912, 1907. — ⁶ Bechhold u. Rosenberg, Biochem. Zeitschr. Bd. 157, S. 85, 1925. — ⁷ Chickering, Journ. of exp. Med. Vol. 22, P. 248, 1915. — ⁸ Eisenberg u. Volk, Zeitschr. f. Hygiene u. Infektionskr. Bd. 40, S. 155, 1902. — ⁹ Hirschfeld und Klinger, Biochem. Zeitschr. Bd. 83, S. 228, 1917. — ¹⁰ Henseval, Comp. ren. Soc. Biol. Tome 82, P. 228, 1917. — ¹¹ Hahn u. Trommsdorff, München. med. Wochenschr. S. 415, 1900. — ¹² Furuhashi, Japan. med. World No. 16, P. 1, 1921. — ¹³ Huntoon, Journ. of Immun. Vol. 6, P. 123, 1921. — ¹⁴ Haku, Arbeiten a. d. Med. Fakultät Okayama Bd. 1, S. 246, 1929. — ¹⁵ Halban u. Landsteiner, Münch. med. Wochenschr. 49, Nr. 12, 1902. — ¹⁶ Hirschfeld, Arch. f. Hyg. Bd. 60, S. 298, 1907. — ¹⁷ Israel Weinstein, Journ. of Immun. Vol. 3, P. 17, 1918. — ¹⁸ Inouye, Okayama Igakkai Zassi Nr. 10, S. 2520, 1930. — ¹⁹ Jobling, Zeitschr. f. Hyg. Bd. 53, S. 554, 1906. — ²⁰ Joos, Centralbl. f. Bakter. Bd. 33, S. 262, 1903. — ²¹ Kosakai, Journ. of Immun. Vol. 3, 1918. — ²² Kuwana, Okayama Igakkai Zassi Nr. 7, P. 1801, 1931. — ²³ Kawashima, Biochem. Zeitschr. Bd. 31, S. 135, 1911. — ²⁴ Kraus u. Pirquet, Zentralbl. f. Bakter. Bd. 32, S. 60, 1902. — ²⁵ Landsteiner, Wien. kl. Wochenschr. S. 1623, 1909 u. Münch. med. Wochenschr. S. 1905, 1902. — ²⁶ Laubheimer u. Vollmar, Zeitschr. f. Hyg. Vol. 106, S. 202, 1925. — ²⁷ Landsteiner u. Jagic, München. med. Wochenschr. S. 764, 1903. — ²⁸ Leiberman u. v. Fenyvossy, Centralbl.

- f. Bakt. Bk. 47, S. 274, 1908. — ²⁹ *Landsteiner*, München. med. Wochenschr. Nr. 27, 1904. — ³⁰ *Michaelis u. Rona*, Biochem. Zeitschr. Bd. 97, S. 57, 1919. — ³¹ *Marschall u. Welker*, J. Am. chem. Soc. Vol. 35, P. 820, 1913. — ³² *M. u. N. Stern*, klin. Wochenschr. S. 36, 1923. — ³³ *Matsui*, zit. n. Haku. Arbeit. a. d. med. Fakul. Okayama Bd. 1, S. 246, 1929. — ³⁴ *Morgenroth*, Münch. med. Wochenschr. Nr. 2, S. 50, 1930. — ³⁵ *Morgenroth u. Bieling*, Bioch. Zeitschr. Bd. 68, S. 85, 1915 u. Bd. 131, S. 535 u. 541, 1922. — ³⁶ *Masuda*, Nippon Biseibutsugaku Zassi Bd. 27, S. 927, 1933 (Japanisch). — ³⁷ *Miwa*, Nippon Eiseigaku Saikingaku Zassi Bd. 17, S. 179, 1922 (Japanisch). — ³⁸ *Nelson*, J. of exp. Med. Vol. 48, P. 825, 1928 u. Vol. 50, P. 377, 1929. — ³⁹ *Neisser u. Shiga*, Deut. med. Wochenschr. Nr. 4, 1903. — ⁴⁰ *Naķamoto*, Eiseigaku Densenbyogaku Zassi Bd. 20, S. 515 u. Bd. 21 (Japanisch). — ⁴¹ *Ogata*, Zeitschr. f. Immforschg. Bd. 39, S. 270, 1924. — ⁴² *Olitzķi*, Z. f. Immforschg. Bd. 72, S. 498, 1931. — ⁴³ *Ogata*, Vortrag in der hygienischen, mikrobiologischen und parasitologischen Generalversammlung in Japan 1927. — ⁴⁴ *Pietro Rondoni*, Zeitschr. f. Imm. Bd. 7, S. 515, 1910. — ⁴⁵ *Pick*, Beitr. z. chem. Phys. u. Path. Bd. 1, S. 351, 1902. — ⁴⁶ *Pauli u. seine Mitarbeiter*. Kolloidchemie d. Eiweißkörper S. 1. — ⁴⁷ *Philosophow*, Biochem. Zeitschr. Bd. 31, S. 135, 1911. — ⁴⁸ *Porges*, Zentralbl. f. Bakt. Bd. 41, S. 466, 1906. — ⁴⁹ *Rock u. Hirsch*, J. of Infec. Diseas. Vol. 35, P. 519, 1924 u. Vol. 37, P. 449, 1925. — ⁵⁰ *Rosenthal*, Bioch. Zeitschr. Bd. 42, S. 7, 1912 u. Bd. 46, S. 225, 1912. — ⁵¹ *Sumi*, Okayama Igakkai Zassi No. 517, P. 417, 1933. — ⁵² *Sunouchi*, Igaku Cyuo Zassi Bd. 26, S. 1, 1928 (Japanisch) u. Okayama Igakkai Zassi No. 8, S. 1740, 1929. — ⁵³ *Tizzoni u. Cattani*, Zentralbl. f. Bakt. Bd. 9, S. 685, 1891. — ⁵⁴ *Tropp*, Zeitschr. f. Immforschg. Bd. 70, S. 289, 1931. — ⁵⁵ *Takeshita*, Eiseigaku Densenbyogaku Zassi Bd. 26, S. 826, 1930 (Japanisch). — ⁵⁶ *Tohma*, Okayama Igakkai Zassi Nr. 12, S. 3189, 1931. — ⁵⁷ *Widal et Sicard*, Ann. d. L'Inst. Pasteur T. II, P. 353, 1897. — ⁵⁸ *Winterberg*, Zeitschr. f. Hyg. Bd. 32, S. 375, 1899. — ⁵⁹ *G. H. Wells*, Zit. n. Handb. d. path. Mikroorg. II/2, 1901. — ⁶⁰ *Ciensa u. Goldy*, zit. n. Handb. d. path. Mikroorg. II (1), 203, 1929. — ⁶¹ *Pauli*, Bioch. Zeitschr. Bd. 152, S. 355 u. 360, 1924. — ⁶² *Pincussohn*, Med. Chem. Laboratoriums-Hilfsbuch S. 338, 1912. — ⁶³ *Hata*, Zentralbl. f. Bakt. orig. Bd. 48, H. 2, 1909. — ⁶⁴ *Eagl*, J. of Imm. Bd. 18, S. 393, 1930 u. Bd. 23, S. 153, 1932. — ⁶⁵ *Kageyama*, Okayama Igakkai Zassi No. 43, S. 684, 1926. — ⁶⁶ *Hamburger*, Fol. haemat. Vol. 2, P. 534, 1905. — ⁶⁷ *Dreyer*, zit. n. Hirschfeld, Arch. f. Hyg. Bd. 60, S. 298, 1907. — ⁶⁸ *Buxton*, zit. aus ebenda. — ⁶⁹ *Scheller*, Zentralbl. f. Bakt. Bd. 26, S. 698, 1904. — ⁷⁰ *Kubota*, Eiseigaku Densenbyogaku Zassi Bd. 23, S. 737, 1927 (Japanisch). — ⁷¹ *Shibley*, Journ. of exp. Med. S. 667, 1926.