

## Isolierung der tuberkulinaktiven Proteine aus dem Tuberkulin mit Hilfe von Dextran-Gel

Im Rahmen unserer Untersuchungen<sup>1-3</sup> über die Spezifität der Tuberkuloproteine in erhitzen humanen, bovinen und aviären Tuberkulosebakterien-Kulturfiltraten trat das Problem auf, die biologisch aktiven Substanzen aus dem Tuberkulin in grösseren Mengen rasch, exakt und ungefährlich für den Untersuchenden isolieren zu können. Die Trennung der spezifischen tuberkulinaktiven Proteine von den im Tuberkulin noch enthaltenen Lipiden, Polysacchariden, Nukleinsäuren und Nährbodenbestandteilen mit den bisher üblichen Fällungsmitteln wie Trichloressigsäure, Methanol, Ammonsulfat u.a. ist nicht nur umständlich und gelegentlich mit einer Verminderung der biologischen Wirksamkeit verbunden, sondern die gefällten Fraktionen enthalten auch noch grössere Mengen an Fremdstoffen<sup>4</sup>.

Eine Reihe von Arbeiten der letzten Zeit zeigten, dass die Methode der Gelfiltration mittels Dextran-Gel ein einfaches Verfahren darstellt, die einzelnen Bestandteile biologischer Gemische je nach den Unterschieden in ihren Molekülgrössen rasch zu trennen oder zu fraktionieren. Da ausserdem das Dextran-Gel sich gegen biologische Substanzen indifferent verhält und deren Aktivität erhalten bleibt, versuchten wir, die tuberkulinaktiven Proteine durch Gelfiltration aus den erhitzen Kulturfiltraten zu isolieren.

Als Dextran-Gel benutzten wir Sephadex G 50 medium (Pharmacia, Uppsala, Schweden). Die Präparation der Säule erfolgte nach den Angaben der Herstellerfirma. Für die Aequilibrierung der Chromatographiesäule und die Elution der aufgetragenen Tuberkulosebakterien-Kulturfiltrate wurde isotone Natriumchloridlösung verwendet. Hitzezentriertes albumosefreies Tuberkulin musste vor der Filtration mit derselben Lösung im Verhältnis 1:2 verdünnt werden, da dieses Präparat zu viskos ist und infolge von Schwanzbildung die Säule unregelmässig durchläuft. Das Eluat wurde in 3 ml-Fraktionen aufgefangen.

Die Untersuchungen der einzelnen Fraktionen ergaben, dass aus einer Sephadex-G-50-Säule zuerst die Tuberkuloproteine austreten. Die Menge des in die Säule eingebrachten Tuberkuloprotein-Stickstoffes konnte verlustfrei in dieser Zone wiedergefunden werden. In den letzten Fraktionen des Proteinbereiches jedoch waren neben den Eiweisskörpern bereits Lipide und Spuren von Polysacchariden nachweisbar. Alle Fraktionen dieser Tuberkuloproteinzone erwiesen sich im Tierversuch bei mit humanen, bovinen und aviären Tuberkulosebakterien sensibilisierten Meerschweinchen und bei tuberkulösen Rindern als biologisch hoch aktiv, wobei Wirkungsmaxima im ersten und zweiten Drittel dieses Bereiches festzustellen waren.

Die der Eiweisszone folgenden Fraktionen zeigten bei der Auswertung an sensibilisierten Meerschweinchen und tuberkulösen Rindern in keinem Fall biologische Aktivität. Desgleichen war Tuberkuloprotein-Stickstoff nicht mehr nachweisbar. Bei der qualitativen Untersuchung konnten Lipide, Nukleinsäuren, Polysaccharide, Aminozucker und Nährbodenbestandteile, insbesonders Asparagin und Glyzerin festgestellt werden.

**Summary.** By filtering heated filtrates of the cultures of *Mycobacterium tuberculosis* human, bovine and avian type respectively through the dextran-gel Sephadex 50, it is possible to separate the tuberculoproteins from the other inactive constituents in a simple manner.

W. STÖCKL, W. KROCZA und H. MATHOIS

Bundesanstalt für Tierseuchenbekämpfung in Mödling bei Wien und Bundesanstalt für Virusseuchenbekämpfung bei Haustieren in Wien-Atzgersdorf (Österreich), 2. Juli, 1962.

<sup>1</sup> W. STÖCKL und H. MATHOIS, Wien, tierärztl. Mschr. **47**, 683 (1960).

<sup>2</sup> H. MATHOIS, H. SPADIUT und W. STÖCKL, Wien, tierärztl. Mschr. **47**, 833 (1960).

<sup>3</sup> W. STÖCKL, Berliner Medizin **12**, 177 (1961).

<sup>4</sup> D. S. P. PATTERSON, Tubercl. **40**, 71 (1959); **41**, 186 (1960).

The results indicate that the cuticle of the liver fluke consists of protein, since it is disintegrated by a series of proteolytic enzymes. Since the other tested enzymes had no visible effect on the cuticle with the technique used, the carbohydrate- and lipid-splitting enzymes were tested on histological sections.

(2) For studying components of carbohydrate nature, the flukes were fixed in Carnoy's fluid. Sections were treated with the carbohydrate-splitting enzymes, listed in the Table, for 1 and 3 h at pH 5.5-6.0 and + 37°C and subsequently stained according to the periodic acid-Shiff (PAS) method. Other sections were stained without previous treatment with enzymes. Some of these sections were stretched on ethanol and provided with a film of collodion before staining, whereas others were prepared without these precautions.

In untreated sections the cuticle was lined by a distinctly PAS-positive rim, whereas the inner part of it was faintly PAS-positive with small, strongly PAS-positive granules

<sup>1</sup> A. PASSATH, Wien, Tierärztl. Monatschr. **49**, 376 (1957).

<sup>2</sup> L. MONNÉ, Arkiv Zool. **12**, 343 (1959).

<sup>3</sup> M. B. LAL and S. C. SHIRVASTAVA, Exper. **16**, 185 (1960).

## Studies on the Action of some Enzymes on the Cuticle of *Fasciola hepatica* L.

The cuticle of trematodes has been studied only to a limited extent from a biochemical and histochemical point of view. Protein<sup>1</sup>, mucopolysaccharides<sup>2</sup> and polyphenols<sup>3</sup> have been described in the cuticle of the liver fluke and in *Fasciola indica* V. The cuticle was shown to be proteinaceous with 1:2 glycol groups but lacking unsaturated lipids<sup>4</sup>. Supposing that a fasciolicidal effect of a substance could be due to its action on or solubility in the cuticle, it was of interest to get information on the nature of the cuticle of *Fasciola hepatica*. Thus the following study with protein-, carbohydrate-, and lipid-splitting enzymes was made:

(1) For each enzyme or enzyme mixture, 3 living adult flukes were placed in 3 ml 0.15 m NaCl (containing < 0.004% Ca<sup>2+</sup>) and 0.01 g enzyme (see Table). Controls were run without enzymes. The experiments were performed under sterile conditions at + 37°C and pH 5.5-6.0. Observations were made, 3 times with intervals of 1 h, in a stereomicroscope at 80×. A disintegrating effect on the surface of the flukes was indicated by + and a negative or vague effect by -- as shown in the Table.