

Untersuchungen über die Reinigung des Protektins Anti-A_{hel} (Anti-AHP) aus *Helix pomatia*

Das Protektin Anti-A_{hel} (Anti-A_{HP}) aus der Eiweissdrüse von *Helix pomatia* agglutiniert nicht nur Blutkörperchen der Gruppe A^{1,2}, sondern darüber hinaus auch verschiedene Bakterienstämme: Einige Stämme von *E. coli* der Serotypen O₂₆, O₈₆, O₁₁₁ und O₁₂₆³, Salmonellen⁴ sowie Streptokokken der Gruppe C⁵. Allen Gruppierungen, die mit Anti-A_{hel} reagieren, ist endständiges N-Acetyl-D-Galactosamin gemeinsam⁶. Der Eiweissdrüsenextrakt ist ein Gemisch aus mehreren Komponenten, woraus sich das agglutinierende Prinzip anreichern bzw. abtrennen lässt.

Material und Methoden. Die Eiweissdrüsen der Schnecken werden zunächst lyophilisiert und pulverisiert. 3 g des Trockenpulvers werden mit 30 ml physiologischer Kochsalzlösung versetzt und bei +4°C 16 h gerührt. Nach Zentrifugation (10 min bei 5000 U/min) wird der Rückstand erneut dieser Behandlung unterworfen. Selbst nach einer 3. Extraktion ist der Überstand noch agglutinationsfähig. Die vereinigten Überstände werden gegen destilliertes Wasser salzfrei dialysiert und lyophilisiert. Diese lyophilisierte Substanz wird im weiteren als Rohextrakt bezeichnet.

Fraktionierungen an DEAE-Zellulose, CM-Zellulose und Sephadex G 200 wurden durchgeführt. Als Kriterium für die Einheitlichkeit der einzelnen bei der Fraktionierung erhaltenen Gipfel zogen wir die Disk-Elektrophorese^{7,8} als die derzeit leistungsfähigste Trennmethode heran. Weiterhin untersuchen wir die Agglutinationsfähigkeit. Dabei gilt als Standardkonzentration eine Einwage von 10 mg lyophilisierter Substanz in 1 ml physiologischer Kochsalzlösung. Die Agglutinationsstärke wird durch das Testen einer Verdünnungsreihe bestimmt, die mit einer Verdünnung von 1:10 beginnt und dann als Potenzreihe mit dem Faktor 1/2 fortgesetzt wird: 1:20, 40, 80, 160 ..., bis schliesslich keine Agglutination mehr eintritt.

1. Fraktionierung an DEAE-Zellulose. Säule 2,5 × 25 cm. Der Ionenaustauscher wird mit 0,005 M Puffer pH 7,0 äquilibriert. 300 mg lyophilisierten Rohextraktes, in etwa 50 ml des gleichen Puffers gelöst, werden auf die Säule aufgetragen. Die Elution wird mit 3 verschiedenen Puffern vorgenommen: a) 250 ml 0,005 M Na₂PO₄ · 2H₂O, pH 7,0; b) 250 ml 0,05 M Na₂PO₄ · 2H₂O, pH 7,0; c) 250 ml 0,2 M Na₂PO₄ · 2H₂O + 0,5 M NaCl, pH 7,0.

Die 3 Puffer werden in der angegebenen Reihenfolge nacheinander durch elektronisch gesteuerte Magnetventile auf die Säule gegeben. Die Extinktion des Eluates wird in einem UV-Durchflussabsorptiometer gemessen und registriert. Das Elutionsdiagramm zeigt 3 Gipfel. Der erste enthält die gesamte serologische Aktivität, während der zweite und dritte negativ sind bzw. nur Spuren zeigen. Die Fraktionen des ersten Peaks werden vereinigt, gegen destilliertes Wasser dialysiert und im Anschluss daran an CM-Zellulose fraktioniert (Figur 1).

2. Fraktionierung an CM-Zellulose. Säule 2,5 × 20 cm. Der Ionenaustauscher wird mit 0,005 M Dinatriumhydrogenphosphatpuffer, pH 4,0, äquilibriert. 300 mg Rohextrakt werden in ca. 50 ml physiologischer Kochsalzlösung gelöst und auf die Säule aufgetragen. Elutionsprogramm: a) 250 ml 0,005 M Na₂HPO₄ · 2H₂O, pH 4,0; b) 250 ml 0,05 M Na₂HPO₄ · 2H₂O, pH 7,0; c) 250 ml 0,2 M Na₂HPO₄ · 2H₂O + 0,5 M NaCl, pH 7,0.

Bei dieser chromatographischen Trennung erhält man 2 Gipfel etwa gleicher Grösse (Figur 2). Der zweite enthält die serologische Aktivität. Bei der Fraktionierung des an CM-Zellulose aktiven Gipfels an Sephadex G 200 ergibt sich ein überraschendes Bild: Es zeigt sich ein einziger Gipfel, der praktisch keine Agglutinationsfähigkeit be-

sitzt. Dieser Gipfel ergibt in der Disk-Elektrophorese nur noch eine einzige Bande. Das bedeutet, dass die zweite Komponente, die offenbar Träger des agglutinierenden Prinzips ist, vom Sephadex absorbiert wird. Im weiteren Verlauf der Elution zeigt sich bei einigen Fraktionen eine schwache Agglutinationsfähigkeit, obwohl das UV-Durchflussabsorptiometer kein Ansteigen der Extinktion registriert. Das bedeutet, dass die zweite Komponente, die offenbar an das Sephadex absorbiert ist, sehr stark verdünnt im Laufe der Zeit ausgewaschen wird. Die Elution des Protektins erfolgt dann entweder mit 6 M Harnstofflösung oder noch besser mit 0,5 M Glukose in 0,05 M Phosphatpuffer pH 7,0. Das Protektin wandert mit der Glukosefront und erscheint als Gipfel im Eluat. Die Glukose wird durch Dialyse entfernt und die wässrige Lösung

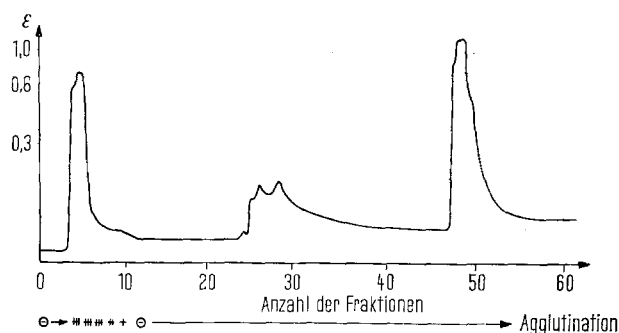


Fig. 1. Fraktionierung von *Helix pomatia* Rohextrakt an DEAE-Zellulose.

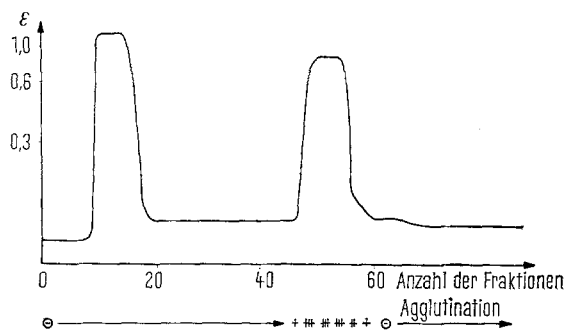


Fig. 2. Fraktionierung von *Helix pomatia* Rohextrakt an CM-Zellulose.

1. O. PROKOP, A. RACKWITZ und D. SCHLESINGER, J. forens. Med. 12, 108 (1968).
2. O. PROKOP, D. SCHLESINGER und A. RACKWITZ, Z. Immunforsch. exp. Ther. 129, 402 (1965).
3. G. UHLENBRUCK, O. PROKOP und W. HAERLAND, Zentbl. Bakt. ParasitKde. I 199, 271 (1965).
4. W. HAERLAND, O. PROKOP, G. UHLENBRUCK und J. ULRICH, Festschrift für Herbert Eibel, Lübeck 1967 (Vorgetragen von O. PROKOP, Tagung Dt. Ges. für Ger. Med., Freiburg 1966).
5. W. KÖHLER und O. PROKOP, Z. Immunforsch. exp. Ther. 133, 50 (1967).
6. G. UHLENBRUCK und O. PROKOP, Vox Sang. 11, 519 (1966).
7. L. ORNSTEIN, Ann. N.Y. Acad. Sci. 121, 321 (1967).
8. B. J. DAVIS, Ann. N.Y. Acad. Sci. 121, 404 (1964).

[illegible]

○ —————> (+) * * * * + + (+) ○ Agglutination

Figure 1 shows three lanes of a gel electrophoresis experiment. Lane 1 contains a single, dark, rectangular band located in the upper third of the lane. Lane 2 contains two distinct, dark, rectangular bands, one slightly above the other, both in the upper third of the lane. Lane 3 contains a single, dark, rectangular band located in the upper third of the lane, similar in position to the band in Lane 1.

⁹ Frau R. JOHN und Frau B. HOFFMANN sind wir für die gewissenhafte Durchführung der experimentellen Arbeiten zu Dank verpflichtet.