

Institut für Immunologie der Universität Wien

Biochemische Grundlagen der Bestimmung von Sojaprotein mit immunologischen Methoden

E. J. Menzel

Mit 5 Abbildungen und 6 Tabellen

(Eingegangen am 13. September 1980)

Sojabohnen werden weltweit zur Ölgewinnung kultiviert. Sojaprotein wird in steigendem Maß als Ersatz für oder Ergänzung von tierischem Protein verwendet. In diesem Zusammenhang ist die serumcholesterinsenkende Wirkung von Sojaprotein zu erwähnen, die im Tierexperiment festgestellt wurde (1, 2). Gleichfalls von Interesse ist Sojamehl als Zusatz zu Weizenmehl bei der Bereitung von Diabetikerbrot. Im Gegensatz zur langen Geschichte der Anwendung von Sojaprotein als Nahrungsmittel setzte die exakte Erforschung der Biochemie der Sojaproteine, vor allem der Sojabohnenglobuline („Speicherproteine“), erst vor etwas mehr als zehn Jahren ein. Im Jahre 1968 wurden von Catsimpoolas et al. (3) zum ersten Mal immunologische Methoden zur Charakterisierung von Sojaproteinen herangezogen. Die Autoren zeigten, daß die Sojaglobuline, wie sie in den „Proteinkörpern“ („protein bodies“) von Sojabohnen vorhanden sind, aus vier bis sechs distinkten antigenen Komponenten zusammengesetzt sind, von welchen zwei, nämlich β - und γ -Conglycinin, nicht durch Ultrazentrifugation getrennt werden können, weil sie beide 7S-Komponenten darstellen. Hingegen gelingt ihre analytische Trennung auf immunologischem Weg, etwa durch Immunelektrophorese, ohne Schwierigkeiten (3, 4). Immunologische Techniken sind jedoch auch über die Grundlagenforschung hinaus für die Bestimmung von Sojaprotein in Nahrungsmitteln, zum Beispiel Fleischwaren, von Bedeutung. Diese Methoden ermöglichen den spezifischen quantitativen Nachweis von Substanzen in komplexen Substanzgemischen, selbst wenn diese Substanzen in äußerst geringen Konzentrationen vorliegen (5–7).

Die besondere Schwierigkeit bei der immunologischen Quantifizierung von Sojaprotein in Lebensmitteln liegt darin, daß das Sojaprotein nicht in nativer, sondern in mehr oder minder thermisch denaturierter Form vorliegt (z. B. durch Autoklavieren), wobei die 11S-Komponente der Sojaglobuline, das Glycinin, am stabilsten gegenüber thermischer Belastung ist (8). Neben Konformationsänderungen bedingen thermische Belastungen auch molekulare Assoziation, aber auch Dissoziation (6). Dies alles wirkt sich in einer Änderung der immunologischen Eigenschaften von Sojaprotein aus. Die denaturierten Proteine reagieren mit ihren nativen „Gegenbildern“ kreuz, wobei der Grad der feststellbaren Kreuzreakti-

vität von der angewandten Methodik abhängt (6). Diese besonders mit radioimmunologischen Methoden nachweisbare Kreuzreakтивität bedeutet, daß die relevanten immunologischen Determinanten von Sojaprotein zumindest teilweise sequentieller Natur sein dürften (6).

In der vorliegenden Studie sollen die biochemischen Grundlagen der quantitativen Erfassung von Sojaprotein mit immunologischen Methoden beschrieben werden, wobei auf die thermische und chemische Denaturierung des Sojaproteins näher eingegangen wird.

Material und Methoden

Antigene: Als Antigene wurden Promine-D-Extrakte verwendet (Promine-D, PD, Central Soya Company, Chicago, Ill., USA): „PD-RT“, PD bei Raumtemperatur extrahiert; „PD-100“, PD bei 100 °C extrahiert; „PD-125“, PD bei 125 °C autoklaviert. Zur Extraktion wurde ein Phosphatpuffer folgender Zusammensetzung verwendet: 7,42 g K₂HPO₄ · 2 H₂O/l, 0,35 g KH₂PO₄/l, 23,38 g NaCl/l, pH 7,6, Ionenstärke 0,5. Extraktion oder Autoklavierung erfolgte während 30 Minuten. Nach der Extraktion wurde die Suspension zentrifugiert (5 000 g, 30 min, 4 °C). Die klaren Überstände wurden teilweise mit 6m-Guanidinhydrochlorid weiterbehandelt (1 Stunde röhren bei Raumtemperatur): z. B. „PD-RT-Gu“. Neben PD wurde als Ausgangsmaterial zur Gewinnung von löslichem Sojaprotein Sojabohnenacetopulver (Sigma, Saint Louis, USA) sowie Sojamehl (*Esta*-Kost, Nahrungsmittel G. m. b. H., Wien) verwendet, die in analoger Weise wie PD extrahiert und teilweise durch Zusatz von 6m-Guanidin-HCl disaggregiert wurden: „SBA-RT“, „SM-RT“ usw. Im Falle des Sojamehls wurde jedoch statt mit dem oben beschriebenen Phosphatpuffer hoher Ionenstärke mit PBS (pH 7,2, I = 0,15) extrahiert.

Antisera: Kaninchen (2,5–3,0 kg) wurden in Gruppen zu je 5 Tieren mit den verschiedenen PD-Antigenen unter Zusatz von komplettem Freundschem Adjuvans (CFA) immunisiert (6). Die Antikörperbildung wurde mit Hilfe der passiven Hämagglutination (s. u.) verfolgt, wobei PD-beladene Erythrozyten zur Anwendung kamen. Passive Hämagglutination: Tanierte humane Erythrozyten wurden mit PD der geeigneten Konzentration sensibilisiert (6). Die Inhibition der passiven Hämagglutination wurde zur semiquantitativen Bestimmung von Sojaprotein herangezogen. Dabei wurde in einer Verdünnungsreihe zu den einzelnen Antiserumverdünnungen (Anti-PD) das gleiche Volumen an Sojaproteinklösung (Probe und Standards) zugesetzt und nach Inkubation bei 37 °C während 30 Minuten der Hämagglutinationstiter im Vergleich zur ungehemmten Serumprobe ermittelt. Hemmungen um mindestens zwei Verdünnungsstufen wurden als signifikant angesehen.

Radioimmuntest: Die radioimmunologische Bestimmung von Sojaprotein erfolgte in einem Solid-Phase Radioimmunoassay (6).

Immundiffusion und Immunelektrophorese: Als Diffusionsmedium wurde 1,5 %iger Agar in veronalgepuffter Saline, pH 8,6, verwendet.

Gelfiltration: Als Gelfiltrationsmedien wurden Dextrangele und Agarosegele eingesetzt.

Sedimentationsanalyse: Die Sedimentationsanalyse wurde auf einer analytischen Ultrazentrifuge Modell Spinco E der Firma Beckman durchgeführt. Die Umdrehungsgeschwindigkeit betrug 52 000 UpM und die Trenntemperatur 20 °C. Die Sedimentationskonstanten wurden mit Hilfe der Schlierenoptik bestimmt.

Polyacrylamideelektrophorese: Die Trennungen wurden in dem von Maurer (9) angegebenen Trennmedium System Nr. 1 durchgeführt.

Isoelektrische Fokussierung: Die Fokussierung erfolgte im pH-Bereich von 3,5 bis 9,5 (7) auf einem Multiphor-Gerät von LKB. Als Stromquelle diente ein LKB Power Supply Typ 3371 C. Die Spannung wurde am Anfang alle 5 und dann alle 10

bis 15 Minuten erhöht. Die Dauer der Fokussierung betrug 2,5 Stunden. Gefärbt wurden die Gelpflatten mit Coomassie Brilliant Blue. Weitere Einzelheiten sind in (7) angegeben.

Proteinbestimmung: Die Proteinbestimmung erfolgte nach Lowry et al. (10).

Dissoziationsstudien: PD-, SM- oder SBA-Extrakte wurden mit 6m-Harnstoff oder 6m-Guanidinhydrochlorid bei Raumtemperatur eine Stunde gerührt. Das dissoziative Agens wurde hierauf durch Dialyse gegen den Extraktionspuffer entfernt. Die mit Guanidin-HCl behandelten Produkte erhalten die Bezeichnung „Gu“, zum Beispiel PD-125-Gu.

Isolierung der 11S- und 7S-Globuline aus Sojabohnenschrot: Die Isolierung des 11S-Globulins erfolgte nach dem von Wolf et al. (11) angegebenen Verfahren. Die 7S-Globuline wurden nach Koshiyama (12) hergestellt.

Affinitätschromatographie: Die 11S- bzw. 7S-Globuline wurden an CNBr-aktivierte Sepharose (Pharmacia, Uppsala, Schweden) gekoppelt. Die durch Aussalzen mit Ammonsulfat gewonnene Immunglobulinfraktion eines Anti-PD-RT-Serums diente als Ausgangsmaterial zur Isolierung von Anti-7S-Globulinantikörpern sowie Anti-11S-Globulinantikörpern mittels Affinitätschromatographie über die entsprechenden Sojaglobulin-Sepharosesäulen. Die Elution der spezifischen Antikörperfraktionen erfolgte mit 0,1 m-Glycin-HCl-Puffer vom pH 2,8. Die Spezifität dieser Antikörper wurde in der Immunelektrophorese und in der passiven Hämaggultination getestet.

Resultate

1. Immunisierungsversuche

Die Immunogenität des nativen Sojaproteins am Beispiel von Promine D, der „Caseinfaktion“ von Sojaprotein, wurde mit jener des thermisch denaturierten Produkts verglichen. Die Antikörperproduktion wurde mittels der passiven Hämaggultination verfolgt. Zur Feststellung,

Tab. 1. Ergebnisse der Immunisierung von Kaninchen mit nativem PD, PD-100 und PD-125. Angegeben sind die reziproken Hämaggultinationstiter. +, Anwesenheit von präzipitierenden Antikörpern. Kan. 1-5 imm. mit PD-RT, 6-10 mit PD-100 und 11-15 mit PD-125.

Kaninchen Nr.	Hämaggultinationstiter mit		
	PD-RT	PD-100	PD-125
1	1280 +	80	-
2	2560 +	640 +	-
3	51200 +	800 +	-
4	4096 +	256 +	-
5	640 +	40	-
6	5120	640	-
7	1280 +	640 +	-
8	2560	640	-
9	640 +	80 +	-
10	1280	320	-
11	-	-	-
12	-	-	-
13	-	-	-
14	-	-	-
15	-	-	-

ob präzipitierende Antikörper gebildet wurden, kam die Agargelimmundiffusion zur Anwendung. Die Ergebnisse der Immunisierungsexperimente sind in Tabelle 1 wiedergegeben. Es ergab sich, daß mit autoklaviertem PD (PD-125) keinerlei Titer gegen das Antigen erzielt werden konnte, während sowohl mit nativem PD als mit PD-100 deutliche Hämagglutinationstiter auftraten. Es ließ sich weiter eine deutliche Kreuzreaktion zwischen beiden letzteren Antigenen feststellen, wobei Anti-PD-100-Seren sogar deutlicher mit PD-RT als mit PD-100 reagierten. Hingegen ergab sich keinerlei Kreuzreaktion mit dem autoklavierten PD-Antigen.

Im Rahmen der Zielsatzung, autoklaviertes PD und ganz allgemein autoklaviertes Sojaprotein mit immunologischen Methoden zu bestimmen, ergab sich somit das Problem, Antiseren gegen dieses denaturierte Antigengemisch zu erzeugen. Da die direkte Gewinnung eines Anti-PD-125-Serums, wie oben gezeigt, mißlang, wurde im folgenden versucht, durch verschiedene chemische Agenzien die thermisch bedingte Molekülassoziation wieder rückgängig zu machen. Es wurde dabei von der Vermutung ausgegangen, daß die Ursache für die geringe Immunogenität des autoklavierten PD in der durch Aggregation bewirkten Abnahme der pro Milligramm Antigenprotein vorhandenen und nicht abgeschirmten Determinanten zu suchen ist.

2. Assoziationsvorgänge bei der thermischen Denaturierung von Sojaprotein und ihre Rückgängigmachung durch chemische Agenzien

Autoklavierung von Sojaprotein verursacht Molekülassoziation: Gelfiltration von PD-125 über Sepharose 4B ergab, daß in dem Produkt im Gegensatz zu nativem PD oder auch PD-100 signifikante hochmolekulare Proteinanteile mit Molgewichten über 20×10^6 , der Ausschlußgrenze von Sepharose 4B, vorhanden sind: Abbildung 1. Ähnliche Resultate zeigt die Gelfiltration über Biogel A5m (6). Einen weiteren Beweis für die teilweise Assoziation des PD-125 zu hochmolekularen Aggregaten erbrachte die Polyacrylamidgel-Elektrophorese. Das native PD zeigte 7 Bänder, PD-125 jedoch nur 2, die mit den am weitesten wandernden Banden 6 und 7 von PD-RT übereinstimmten. Bei PD-125 ließ sich das Sammelgel (Schicht oberhalb des eigentlich Trenngels) stark anfärben, bei PD-RT jedoch

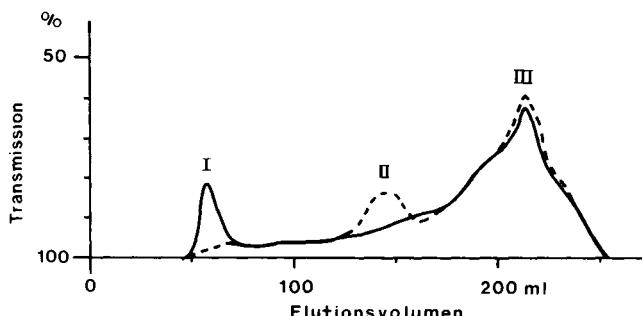


Abb. 1. Gelfiltration von PD-125 (—) und PD-125-Gu (---) über Sepharose 4B in Extraktionspuffer (I = 0,5). Peak I: Hochaggregiertes Material, eluiert im Ausschlußvolumen. Peak II: durch 6m-Guanidin-HCl desaggregiertes Material ($MG = 2 \times 10^6$). Peak III: Salzvolumen.

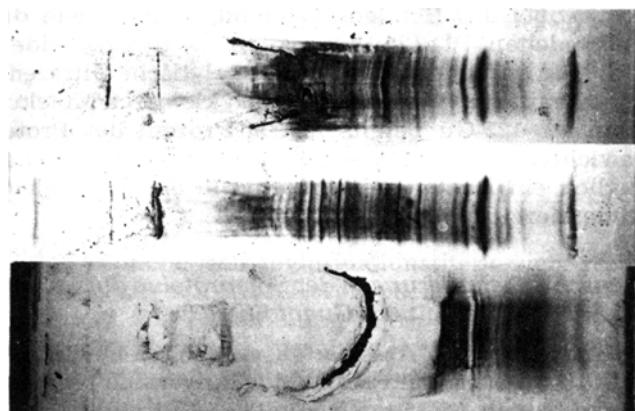


Abb. 2. Bandenmuster der isoelektrischen Fokussierung. Von oben nach unten: PD-RT, Sojabohnenextrakt, PD-125. PH-Bereich: 3,5–9,5. Links Kathode, rechts Anode.

nicht. Dies ist auf die hochmolekularen und daher nicht ins Trenngel einwandernden Proteinanteile von PD-125 zurückzuführen. Der Trennbereich des verwendeten Trenngels liegt zwischen 10^4 und 10^6 . Im isoelektrischen Fokussierungsverfahren (Abb. 2) ergab PD-125 keine gute Trennung. Die in der Abbildung gezeigte geschwungene starke Bande wurde durch die in PD-125 vorhandenen Molekülassoziate hervorgerufen, welche auch durch hochtourige Zentrifugation nicht eliminiert werden konnten (30 000 g).

Es wurde im weiteren versucht, die in autoklaviertem Sojaprotein vorhandenen Aggregate mit chemischen Mitteln abzubauen. Nach den Versuchsergebnissen von Wolf et al. (13) erschienen zunächst Disulfidbindungen spaltende Reagenzien als aussichtsreiche Hilfsmittel zur Verkleinerung der Assoziate. Folgende Substanzen wurden eingesetzt: Mercaptoäthanol (10^{-2} m/l – 10^{-1} m/l) und Dithiothreitol (10^{-5} – 10^{-4} m/l). PD-125 blieb jedoch in allen Fällen stark opaleszierend, und die Gelfiltration erbrachte keinen Hinweis auf eine signifikante Verringerung des Anteils an hochmolekularen Aggregaten. Auch bei der isoelektrischen Fokussierung traten gegenüber dem verschwommenen Bandenmuster von PD-125 keine sichtbaren Veränderungen auf. Offensichtlich liefern Disulfidbindungen nur einen unwesentlichen Beitrag zum Zusammenhalt der Aggregate. Daher wurden im folgenden Reagenzien eingesetzt, die in der Lage sind, nichtkovalent gebundene Proteinuntereinheiten aus ihrem Molekülverband zu lösen. Als derartige Reagenzien kommen vorwiegend Harnstoff und Guanidinhydrochlorid in Frage (14). PD-125 wurde mit beiden Substanzen desaggregiert. Die Dissoziationsreaktion war bei 6m-Guanidin-HCl deutlich stärker als bei 6m-Harnstoff. So verschwand die ursprünglich vorhandene Opaleszenz der PD-125-Lösung nur mit Guanidin-HCl vollständig. Als wesentlichstes Ergebnis der Behandlung mit Guanidin-HCl ist das Verschwinden des 1. Peaks in Abbildung 1 anzusehen. Dies bedeutet, daß die sehr hochmolekularen Aggregate (20×10^6 D) aufgelöst wurden. In der isoelektrischen Fokussierung ergaben sich deut-

liche Banden, wobei das Bandenmuster nicht von jenem der mit 6m-Harnstoff behandelten PD-125-Präparation zu unterscheiden war. Im Sedimentationsbereich unter 15S zeigt die analytische Ultrazentrifugation gleichfalls eine deutliche Verschiebung nach kleineren Molekulargewichten, so daß in PD-125-Gu bereits fast 90 Prozent der Proteine einem Molekulargewichtsbereich $\leq 3S$ angehören, während im nativen PD-Extrakt lediglich ein Drittel aller Proteine in einem vergleichbaren S-Bereich sedimentiert (6).

3. Immunologische Veränderungen der Sojaproteine durch Autoklavieren und durch Behandlung mit 6m-Guanidin-HCl

Neben den geschilderten Assoziationsvorgängen bewirkt Autoklavierung von PD in weit stärkerem Maße Molekülverkleinerung, also Dissoziation. Dies ergibt sich bei vergleichender Gelfiltration von PD-RT und PD-125 über Biogel A-5m (6) sowie bei der analytischen Ultrazentrifugation (6). 6m-Guanidin-HCl bringt keine wesentliche zusätzliche Änderung im Elutionsdiagramm zustande, zumindest was den Bereich $\leq 10\,000$ D betrifft. Ähnliches findet man bei der gelchromatographischen Analyse der Molekulargewichtsverteilung von SBA-Extrakten: SBA-RT zeigt zwei Hauptpeaks bei Trennung über Biogel A-5m, von welchen der erste (ein Drittel des gesamten eluierten Proteins) im Exklusionsvolumen die Säule verläßt. Nach der Autoklavierung dieses Extraktes jedoch erhält man nur mehr einen breiten Doppelpeak, dessen Maxima sehr kleinen Molekulargewichten entsprechen ($< 10\,000$). Nachbehandlung mit 6m-Guanidin-HCl bringt keine wesentliche Veränderung dieses Elutionsverhaltens von SBA-125 mit sich. Ähnlich verhielten sich SM-Extrakte.

Die durch Autoklavieren verursachten Assoziations- und Dissoziationsvorgänge sind wahrscheinlich neben der thermischen Denaturierung für den Verlust der Immunogenität von PD-125 (s. Punkt 1) verantwortlich. In der passiven Hämagglutination und in der Immundiffusion zeigten Antiseren gegen natives PD keinerlei Reaktion mit PD-125. Auch in Inhibitionsversuchen konnte keinerlei Hemmung der Anti-11S- bzw. Anti-7S-Antikörperfraktion von Anti-PD-RT-Serum mit dem autoklavierten PD erzielt werden (Tab. 2). Beide Antikörperfraktionen ergaben jedoch mit PD-RT in der Immunelektrophorese je eine Präzipitatlinie. Umgekehrt zeigte jedes Antigen (7S und 11S) mit Anti-PD-RT ebenfalls nur eine Linie, was die Einheitlichkeit der Präparation beweist.

Immunisierungsversuche mit PD-125-Gu zeigten im Gegensatz zu gleichartigen Experimenten mit PD-125 (Tab. 1) deutliche Erfolge. Es

Tab. 2. Hämagglutinationstiter der Anti-7S- und Anti-11S-Sojaglobulin-Antikörperfraktion von Anti-PD-RT-Serum und ihre Inhibition durch PD-RT und PD-125. Erythrozyten mit PD-RT sensibilisiert.

Antikörperfraktion	-	Hämagglutinationstiter, inhibiert durch:	
		PD-RT (10 mg%)	PD-125 (10 mg%)
Anti-7S	1 : 32	-	1 : 32
Anti-11S	1 : 128	-	1 : 128

Tab. 3. Hämaggglutinationstiter von Kaninchenantiseren gegen PD-125-Gu.

Kaninchen Nr.	Hämaggglutinationstiter gegen PD-125-Gu
16	1 : 4096
17	1 : 33000
18	1 : 1024

erwies sich, daß ähnliche Hämaggglutinationstiter erzielt werden konnten wie bei Immunisierung mit PD-RT (Tab. 3). Die Antikörper waren jedoch nicht präzipitierend. Zur Bestimmung der Spezifität und Kreuzreakтивität dieser Antiseren wurde daher ausschließlich das Verfahren der Hämaggglutinationsinhibition eingesetzt. Als Inhibitoren wurden verwendet: PD-RT, PD-100, PD-125, PD-RT-Gu, PD-100-Gu und PD-125-Gu. Als Kontrollen dienten Glutenin- und Rinderserumalbuminlösungen, autoklaviert und mit Guanidin-HCl nachbehandelt. Als Antiserum kam Serum Nr. 16 von Tabelle 3 zum Einsatz (ungehemmter Titer gegenüber PD-125-Gu beladenen Erythrozyten: 1 : 4 096). Die Hemmkurven sind in Abbildung 3 zu sehen. Es zeigt sich, daß alle PD-Antigenmischungen mit Ausnahme von PD-RT den Anti-PD-125-Gu-Titer bei 1 %iger Inhibitorkonzentration vollständig hemmen. PD-RT hemmt bei dieser Konzentration nur um vier Stufen. Am empfindlichsten reagiert das Antiserum auf PD-125 und PD-125-Gu, wobei zwischen diesen beiden Antigenen keinerlei Unterschied in der Hemmeffizienz zu finden ist. Beide hemmen noch in 10mg %iger

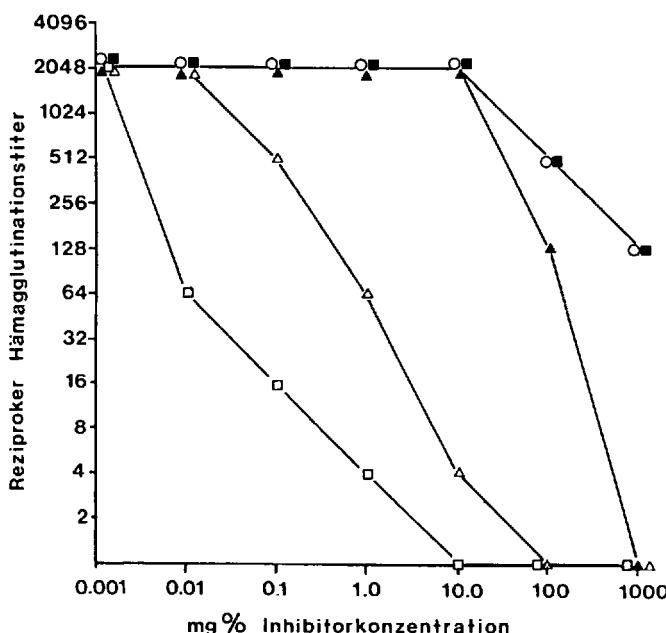


Abb. 3. Passive Hämaggglutination als Inhibitionsverfahren. Inhibitoren: -■-, PD-RT; -▲-, PD-RT-Gu; -○-, PD-100; -△-, PD-100-Gu; -□-, PD-125; -□-, PD-125-Gu.

Konzentration vollständig, in 1mg %iger Konzentration immerhin noch um 9 Stufen, also nahezu vollständig. Dies beweist ihre weitgehende Antigenidentität trotz unterschiedlicher Immunogenität. Die Kontrollproteine ergaben überhaupt keine Hemmung. Die in der Abbildung wiedergegebenen Hemmkurven können bei der semiquantitativen Bestimmung von Sojaproteinen in Nahrungsmittlextrakten als Standardkurven verwendet werden. Die Empfindlichkeit der Methode ist dabei für autoklaviertes PD am höchsten, gleichgültig, ob mit Guanidinhydrochlorid „nachbehandelt“ wurde oder nicht (noch 1 µg/ml dieses autoklavierten Sojaproteins kann erfaßt werden). Der Einfluß von Guanidin-HCl ist auch bei PD-RT gering. Lediglich bei PD-100 zeigt sich nach Guanidin-HCl-Behandlung eine deutliche Zunahme der Inhibitoreffizienz gegenüber dem Anti-PD-125-Gu-Serum.

4. Immunologische Reaktivität von adsorbierten Sojaproteinantigenen

Polystyrolröhren wurden durch Inkubation mit 1mg %igen SBA-Extrakten (SBA-RT, SBA-RT-Gu, SBA-125, SBA-125-Gu) antigenbeladen. SBA-125 wurde durch Autoklavieren von SBA-RT, nicht durch direkte Extraktion von SBA bei Autoklavierungsbedingungen erzeugt. Anti-PD-RT-Seren (Tab. 1) wurden in einem Solid-Phase RIA (6) hinsichtlich ihrer spezifischen Reaktion mit den antigenbeladenen Röhren getestet. Als Kontrolle diente Kaninchennormalserum (KNS), als Blindwert PBS. Die Ergebnisse dieser Bindungsexperimente sind in Tabelle 4 zusammengefaßt. Aus diesen Daten ergibt sich, daß bei Beladung mit nativem SBA-Extrakt der KNS-Bindungswert deutlich höher liegt als jeder Bindungswert der spezifischen Antiseren. Bei SBA-RT-Gu-Röhren liegen die Werte der Antiseren deutlich über der Kontrolle. Ideale Bedingungen ergeben sich jedoch mit SBA-125-Festphasen: hier entspricht der KNS-Wert dem PBS-Blindwert nahezu, die unspezifische Abbindung der KNS-Immunglobuline an diesem adsorbierten Antigen ist somit vernachlässigbar gering. Ähnliche Verhältnisse ergibt Beladung mit SBA-125-Gu. Die verschiedenen Antigen-Antiserum-Systeme wurden nun in Inhibitionstests auf ihre Brauchbarkeit zur radioimmunologischen Bestimmung von Sojaprotein geprüft. Als Inhibitoren wurden wieder die vier vorher erwähnten SBA-Präparationen eingesetzt. Von jedem Inhibitor wurden vier Konzentrationen (1 : 1, 1 : 4, 1 : 16 und 1 : 64) getestet. Tabelle 5 enthält die Ergebnisse dieser Untersuchung. In der Tabelle sind

Tab. 4. Bindungswerte von Anti-PD-RT-Seren (Nr. 1-4 von Tab. 1) im Solid-Phase Radioimmunoassay bei Verwendung folgender adsorbierter SBA-Antigene:

Antiserum Nr.	ng „second antibody“ pro Röhren gebunden bei Beladung mit folgenden Antigenen			
	SBA-RT	SBA-RT-Gu	SBA-125	SBA-125-Gu
1	59,2	58,4	28,9	16,4
2	56,7	56,1	38,1	34,1
3	60,1	62,1	34,3	32,9
4	52,9	57,7	22,4	23,3
KNS	66,1	40,5	0,4	2,4

Tab. 5. Maximale Hemmungen in Prozent des ungehemmten Antiserums im Solid-Phase RIA. Röhrchenbeladung mit SBA-Antigenen. Inhibitoren: SBA-Antigene. Antiseren: Anti-PD-RT-Seren Nr. 1-4 von Tabelle 1. Serie A: Inhibitor SBA-RT (56 mg%); B: SBA-RT-Gu (35 mg%); C: SBA-125 (63 mg%); D: SBA-125-Gu (34 mg%).

Antiserum Nr.		Röhrchenbeladung durch folgende SBA-Antigene			
		SBA-RT	SBA-RT-Gu	SBA-125	SBA-125-Gu
A	1	-	5	37	14
	2	-	-	12	-
	3	5	-	30	18
	4	5	13	15	-
B	1	-	-	33	42
	2	3	10	41	48
	3	7	9	38	24
	4	10	5	33	46
C	1	-	-	58	65
	2	-	-	45	66
	3	-	3	57	58
	4	-	-	59	41
D	1	-	5	68	56
	2	-	-	48	55
	3	-	7	63	54
	4	-	-	50	42

jeweils die durch die höchste Inhibitionskonzentration hervorgerufenen Hemmwerte angegeben. Die mit SBA-RT-Röhrchen erhaltenen Hemmwerte sind aus oben erwähnten Gründen (Tab. 4) insignifikant. Die in den anderen Systemen erzielten geringen Hemmungen bei Anwendung von

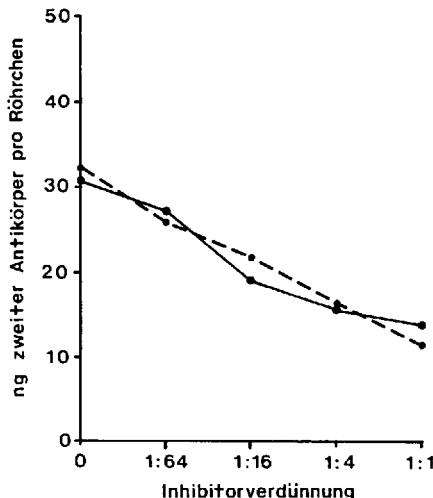


Abb. 4. Standardhemmkurven im Solid-Phase RIA. Antiserum: Nr. 2 von Tabelle 1. Hemmantigen: SBA-125 (63 mg %). Röhrchenbeladung: —, SBA-125; - - -, SBA-125-Gu.

SBA-RT oder SBA-RT-Gu als Inhibitoren sind statistisch nicht signifikant. Lediglich die autoklavierten Antigene ergeben signifikante Inhibitionen, wenn SBA-RT-Gu-, vor allem aber SBA-125-Gu- oder SBA-125-Röhrchen als Solid-Phase benutzt werden. Dabei ist der Grad der Inhibition unabhängig von einer eventuellen Guanidin-HCl-Behandlung des SBA-125, wie sich aus den in Tabelle 5 angegebenen Hemmwerten der vier Antiseren ergibt. Optimale Hemmkurven erhält man gleichfalls mit SBA-125(-Gu), wenn mit demselben Antigen beladene Röhrchen als Festphase verwendet werden. In diesem Fall ist die Empfindlichkeit des radioimmunologischen Nachweises dieses Antigens ungefähr 10 µg/ml. Hier beträgt der Grad der spezifischen Hemmung durchschnittlich 20 % und liegt damit deutlich über der Standardabweichung (Variationskoeffizient < 0,1) des ungehemmten Antiserumbindungswertes. Abbildung 4 zeigt den Verlauf einer derartigen Hemmkurve, die als Standardkurve zur radioimmunologischen Bestimmung von autoklaviertem Sojaprotein herangezogen werden kann, obwohl das verwendete Antiserum durch Immunisieren mit nativem Sojaprotein (PD-RT) gewonnen wurde.

5. Löslichkeit von Sojaprotein (PD) in verschiedenen Extraktionspuffern

Besonders wichtig für die quantitative Bestimmung von Sojaprotein in komplexen Nahrungsmitteln ist die möglichst quantitative Erfassung, also Herauslösung, des Sojaproteins. Es wurden drei verschiedene Extraktionspuffer hinsichtlich ihres Lösungsvermögens für PD getestet: PBS ($I = 0,15$), Extraktionspuffer ($pH = 7,6, I = 0,5$) und 6m-Guanidin-HCl. Zwei Extraktionstemperaturen wurden gewählt: 25 °C und 60 °C. Zur Extraktion wurde eine Suspension von 1 g PD in 20 ml Puffer während 30 Minuten geschüttelt. Die nach Zentrifugation bei 5 000 g im klaren Überstand ermittelten Proteinkonzentrationen (Standard: bovines Serumalbumin) sind in Tabelle 6 angegeben. Hieraus folgt, daß Extraktion mit 6m-Guanidin-HCl bei Raumtemperatur die größte Ausbeute an gelöstem PD ergibt. Auch Autoklavierung brachte keine weitere Steigerung dieses optimalen Wertes.

Diskussion

Die vorliegende Untersuchung beschäftigt sich mit Immunogenität und Antigencharakter von Sojaprotein besonders im Hinblick auf deren Veränderung bei thermischer Denaturierung. Dabei stellte es sich heraus, daß

Tab. 6. Löslichkeit von PD in verschiedenen Extraktionslösungen. Ausgangssuspension: 5prozentiges PD. Extraktionstemperatur: 25 °C oder 60 °C. Klammerwerte: die bei 60 °C gefundene Löslichkeit.

Pufferlösung	Proteinkonzentration (mg%)	Löslichkeit Prozent gelöst
PBS	329 (543)	6,6 (10,9)
Extraktionspuffer ($I = 0,5$)	679 (811)	7,6 (16,2)
6m-Guanidin-HCl	1130 (938)	22,6 (18,8)

Autoklavieren von Promine-D-Extrakten die Immunogenität der gelösten Proteine zerstörte. Durch Inkubation mit Guanidin-HCl (6m/l) und anschließender Dialyse gegen den Extraktionspuffer konnte jedoch die Immunogenität der Proteinlösung wiederhergestellt werden. Der Verlust der Immunogenität von autoklaviertem Sojaprotein läßt sich mit den bei der Autoklavierung auftretenden Assoziations- und Dissoziationsvorgängen erklären. Die Denaturierung konformationeller Determinanten spielt sicher gleichfalls eine Rolle. Durch „Nachbehandlung“ mit 6m-Guanidin-HCl kommt es zur „Auflösung“ der hochmolekularen Aggregate ($\geq 20 \times 10^6$ D), während im Bereich kleiner Molekulargewichte weitere Molekülverkleinerung (< 10 000 D) bewirkt wird. Dies konnte durch Gelfiltration und analytische Ultrazentrifugation gezeigt werden. Da Proteine mit deutlich unter 10 000 D liegenden Molekulargewichten nur geringe Immunogenität erwarten lassen, soll sich die Diskussion der Wiederherstellung der Immunogenität von PD-125 durch Guanidin-HCl-Behandlung auf den hochmolekularen Proteinanteil beschränken (Peak I, Abb. 1). Dessen Verschwinden nach Guanidineinwirkung kann als Hauptursache für die wiedergewonnene Immunogenität von PD-125-Gu angesehen werden, wenn man von der Annahme ausgeht, daß in diesem Peak hochaggregiertes, in monomerer oder geringaggregierter Form aber immunogenes Material (z. B. 11S-Sojaglobulin) vorliegt. Hochaggregierte Antigene sind infolge schlechter Löslichkeit, geringer Diffusibilität, schwieriger Abbaubarkeit und geringer Zahl zugänglicher, also von den Immunzellen erkennbarer Determinanten pro Milligramm Protein nur wenig immunogen. Guanidin-HCl wirkt desaggregierend und führt eine „Auffaltung“ der verborgenen Determinanten herbei. Weitere Immunisierungsversuche etwa mit isoliertem Peak II (Abb. 1) müssen zeigen, ob die Dissoziation des hochmolekularen Proteinanteils in PD-125 wirklich für das Ansteigen der Immunogenität von PD-125-Gu verantwortlich ist.

Durch thermische oder chemische Denaturierung wird jedoch auch der Antigencharakter von PD verändert. Dies zeigt die Untersuchung der Spezifität und Kreuzreakтивität der verschiedenen Antiseren. Während Anti-PD-RT in der passiven Hämagglutination überhaupt nicht mit PD-125 reagierte, zeigten Inhibitionsstudien mit Anti-PD-125-Gu doch geringe Inhibition mit PD-RT. Chemische Denaturierung von PD-RT mit Guanidin-HCl steigerte diese Kreuzreakтивität. PD-100 wies schon deutlichere Hemmwirkung auf, die wieder durch Guanidin-HCl weiter erhöht werden konnte. PD-125 und PD-125-Gu hemmten gleich stark schon in geringen Konzentrationen. Man kann diese Befunde dahingehend interpretieren, daß thermische und chemische Denaturierung in eine Richtung zielen, nämlich auf vollständig denaturiertes („ausdenaturiertes“) PD, wie es PD-125 darstellt, an dessen Antigencharakter auch 6m-Guanidin-HCl nichts mehr ändern kann. Der zusätzliche immunologische Informationsgehalt von PD-125-Gu im Vergleich zu PD-125 beruht somit lediglich auf seiner Immunogenität, nicht aber veränderten Antigenität.

Zur Quantifizierung von Sojaprotein wurden zwei unterschiedlich immunologische Verfahren näher untersucht: passive Hämagglutination und Solid-Phase Radioimmunoassay. Hier stellte es sich heraus, daß brauchbare Standardkurven im Radioimmuntest zur Bestimmung von autoklaviertem Antigen (PD-125) selbst bei Verwendung von Antiseren

gegen das native PD erhalten wurden. In der passiven Hämaggglutination jedoch waren deutliche Hemmefekte nur mit Antiseren gegen PD-125-Gu zu beobachten. Die Nachweisgrenze für autoklaviertes PD liegt im RIA bei 10 µg/ml, in der passiven Hämaggglutination als Inhibitionstest bei 1 µg/ml. Letztere Bestimmungsmethode ist jedoch nur als semiquantitativ anzusehen. Paradoxerweise konnten im Solid-Phase RIA native Sojaproteinantigene mit Antiseren gegen diese Antigene nicht quantifiziert werden. Dies liegt einerseits an der hohen unspezifischen Bindung von Kaninchenimmunglobulinen an mit nativem Sojaprotein beladene Röhrchen, wodurch die spezifischen Bindungswerte von Anti-PD-Seren sich nicht oder nur unzureichend von den KNS-Werten unterscheiden. Andererseits ergibt sich bei Beladung mit autoklaviertem Sojaprotein (SBA-125 oder SBA-125-Gu) infolge der geringen Kreuzreaktivität dieser Antigene mit nativem Sojaprotein (SBA-RT) nur ein geringer (SBA-125) oder vernachlässigbarer (SBA-125-Gu) Hemmefekt, obgleich in diesem Solid-Phase System die KNS-Bindung minimal ist, also in dieser Hinsicht optimale Bedingungen gegeben sind. Lediglich guanidinbehandeltes Sojaprotein (SBA-RT-Gu) kann unter diesen Reaktionsbedingungen im Solid-Phase RIA bestimmt werden. Ausgezeichnet gelingt hingegen die Quantifizierung von autoklaviertem Sojaprotein (SBA-125 oder SBA-125-Gu).

Als Voraussetzung für den quantitativen Nachweis von Sojaprotein in Nahrungsmitteln ist die möglichst vollständige Extraktion desselben anzusehen. Unter mehreren getesteten Extraktionspuffern stellte sich 6m-Guanidin-HCl als optimal heraus. Da in den meisten Nahrungsmitteln Sojaprotein bereits in denaturierter Form vorliegt, ist keine weitere Denaturierung durch das Extraktionsmittel zu erwarten. Außerdem ist autoklaviertes Sojaprotein im Solid-Phase RIA und in der passiven Hämaggglutination mit gleicher Empfindlichkeit nachzuweisen, gleichgültig ob mit Guanidin-HCl behandelt wurde oder nicht.

Die Beobachtung, daß Antiseren gegen natives Sojaprotein in der passiven Hämaggglutination nicht mit autoklaviertem Antigen reagieren,

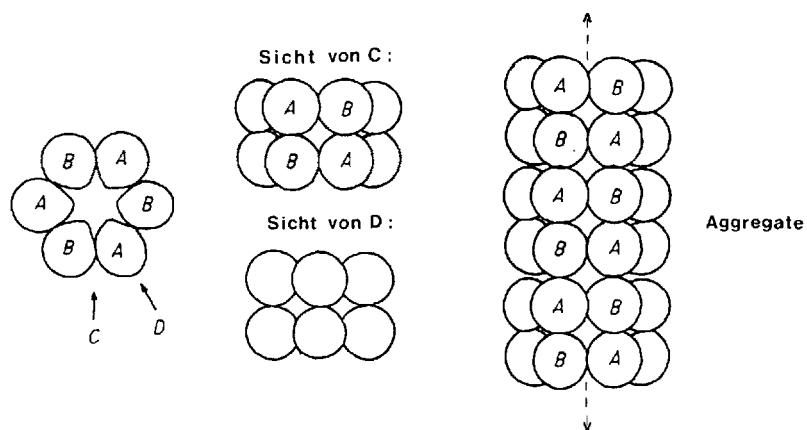


Abb. 5. Möglicher Aggregationsmodus der 11S-Globulinkomponente. 11S-Modell nach (15).

lässt sich mit der Reaktivität der bei dieser Methode besonders wichtigen IgM-Antikörper erklären. Infolge ihrer besonderen Raumstruktur (Pentamere) binden sich IgM-Antikörper besonders stark an Proteinstrukturen mit Vielfachdeterminanten (kooperativer Effekt), wie sie zum Beispiel die Hexamerenoberfläche im 11S-Sojaglobulin (Abb. 5) darstellt. Bei Aggregation in der in dieser Abbildung gezeigten Art nimmt die Verfügbarkeit dieser „Antigenflächen“ ab, wodurch gleichfalls die Inhibitorwirkung gegenüber den spezifischen IgM-Antikörpern reduziert wird. IgG-Antikörper, die im Radioimmunoassay hauptsächlich erfaßt werden, sind infolge ihres kleineren Reaktionsareals von Assoziations- und Dissoziationsvorgängen an Molekülkomplexen sowie von kooperativen Effekten weitgehend unabhängig und zeigen daher auch Kreuzreakтивität mit dem autoklavierten Sojaprotein, sofern radioimmunologische Methoden herangezogen werden.

Zusammenfassung

Durch thermische Denaturierung geht die Immunogenität von Sojaprotein verloren. Inkubation mit 6m-Guanidin-HCl stellt die Immunogenität wieder her. Durch dieses Reagens wird die bei Autoklavieren beobachtete Assoziation eines Teils der Sojaproteine wieder rückgängig gemacht. Dies dürfte die Hauptursache für die Rückgewinnung der Immunogenität sein. Diese Befunde werden im Zusammenhang mit der Bestimmung von autoklaviertem Sojaprotein durch zwei immunologische Verfahren diskutiert: Solid-Phase Radioimmunoassay und passive Hämaggglutination (Inhibitionstest).

Summary

Soy-bean protein loses its immunogenicity by heat treatment through thermal denaturation. Incubation with 6m guanidine-hydrochloride restores the immunogenicity. This reagent causes dissociation of protein aggregates formed during autoclaving of soy protein. This seems to be the major step in the restitution of immunogenicity. These findings are discussed in connection with the quantification of heat-denatured soy-bean protein by two independent immunologic methods: Solid-Phase Radioimmunoassay and Passive Hemagglutination (inhibition test).

Schlüsselwörter: Sojaprotein, Radioimmunoassay (Radioimmuntest), Protein-denaturierung, Passive Hämagglutination (Sojamehl)

Literatur

1. Fumagalli, R., R. Paoletti, A. N. Howard: Hypocholesterolaemic effect of soya. *Life Sci.* **22**, 947 (1978).
2. Huff, M. W., R. M. G. Hamilton, K. K. Carroll: Plasma cholesterol levels in rabbits fed low fat, cholesterol-free, semipurified diets: effects of dietary proteins. *Atherosclerosis* **28**, 187 (1977).
3. Catsimpoolas, N., N. Leuthner, E. W. Meyer: Studies on the characterization of soybean proteins by immunoelectrophoresis. *Arch. Biochem. Biophys.* **127**, 338 (1968).
4. Catsimpoolas, N., C. Ekenstam: Isolation of α -, β - and γ -conglycinins. *Arch. Biochem. Biophys.* **129**, 490 (1969).
5. Poli, G., A. Balsari, W. Ponti, C. Cantoni, L. Massaro: Crossover electrophoresis with indirect immunofluorescence in the detection of soy protein in heated meat products. *J. Food Technol.* **14**, 483 (1979).

6. Menzel, E. J., F. Glatz: Die radioimmunologische Bestimmung von nativem und hitzedenaturiertem Sojaprotein. Z. Lebensmitteluntersuchg.-Forschg., im Druck.
7. Glatz, F.: Untersuchungen zum immunologischen Nachweis eines thermisch denaturierten pflanzlichen Proteins. Dissertation, Techn. Univ. Wien, 1976.
8. Koie, B., R. Djurtoft: Changes in the immunochemical response of soybean proteins as a result of heat treatment. Ann. Nutr. Aliment. **31**, 183 (1977).
9. Maurer, H. R., in: Disc Electrophoresis and related techniques, Walter de Gruyter Verlag, S. 44 (1971).
10. Lowry, O. H., N. J. Rosebrough, A. L. Farr, R. J. Randall: J. Biol. Chem. **193**, 265 (1951).
11. Wolf, W. J., G. E. Babcock, A. K. Smitz: Arch. Biochem. Biophys. **99**, 265 (1962).
12. Koshiyama, I.: Agr. Biol. Chem. **36**, 2255 (1972).
13. Wolf, W. J., G. E. Babcock, A. K. Smith: Nature **191**, 1395 (1961).
14. Tanford, C., in: Advances in protein chemistry **23**, 121 (1968), Academic Press.
15. Badley, R. A., D. Atkinson, H. Hauser, D. Oldani, J. P. Green, J. M. Stubbs: The structure, physical and chemical properties of the soybean protein glycinin. Biochem. Biophys. Acta **412**, 214 (1975).

Anschrift des Verfassers:

Dr. J. Menzel, Institut für Immunologie der Universität Wien, Borschkegasse 8a,
A-1090 Wien