

funden werden, die inaktivierende Wirkung des DDVP kann jedoch im sauren Milieu verstärkt werden (NBW^{Trichlorphon, ungepuffert}).

Die pH-Kurven in den entsprechenden NBW-Ansätzen mit und ohne Bakterien lassen darauf schließen, daß Trichlorphon bzw. seine Umwandlungsprodukte den Bakterienstoffwechsel weitgehend inhibieren.

Zur Deutung der Prozesse, die sich in der Trichlorphon-haltigen Bakterienkultur abspielen, kann man annehmen, daß die Abnahme der ungeschädigten Bakterien im Kurvenabschnitt A (vgl. Abb. 5 a) durch die einander überlagernden Wirkungen des durch hydrolytischen Zerfall bzw. Umwandlung abnehmenden Trichlorphons und des entsprechenden

DDVP bedingt ist. Der Kurvenverlauf im Abschnitt B repräsentiert die Reaktionen der geschädigten Bakterien auf die gleichen, jetzt aber weniger intensiv ablaufenden Prozesse. Der Kurvenabschnitt C spiegelt die Reaktion der stark geschädigten Bakterien auf die nunmehr vorliegende, relativ hohe DDVP-Konzentration wider.

Herrn Prof. Dr. P. HOWARD-FLANDERS, New Haven, danken wir für die Überlassung der Bakterienstämme, Herrn Dr. FRICKE, VEB Fettchemie Karl-Marx-Stadt, für die Überlassung von reinem DDVP. Fräulein A. HUGNIN und Fräulein I. MEUTZNER vom Institut für Biophysik sind wir für die ausgezeichnete technische Assistenz sehr zu Dank verpflichtet.

Serologische Unterschiede von Staphylokokken-Nucleasen

W. SCHARMANN und H. BLOBEL

Institut für Bakteriologie und Immunologie der Veterinärmedizinischen Fakultät
der Justus Liebig-Universität Gießen (Direktor: Prof. Dr. H. BLOBEL)

(Z. Naturforschg. 23 b, 1230—1235 [1968]; eingegangen am 2. Juni 1968)

Nuclease was obtained from respectively 6 characterized staphylococcal strains of "human", "bovine" and "canine" origin and studied immunoelectrophoretically and in the neutralization test. Distinct serological differences were found between the nuclease preparations of the "human" and "bovine" strains on one hand, and the nuclease of the "canine" strains on the other hand.

Staphylococcus aureus bildet eine Reihe von Enzymen und Toxinen, die wahrscheinlich seine Pathogenität bedingen¹. In diesem Zusammenhang ist auch in jüngster Zeit die Staphylokokken-Nuclease genannt worden²⁻⁴. Seit der Beschreibung der „extrazellulären“ Nuclease bei den Staphylokokken ist eine Anzahl von Veröffentlichungen über Reindarstellung und Charakterisierung des Enzyms erschienen⁵⁻¹⁰.

Über die Eigenschaft der Nuclease als Antigen sind dagegen bisher keine Untersuchungen bekannt geworden. Im Hinblick auf die Erforschung der Staphylokokken-Pathogenität wurde deshalb das anti-

gene Verhalten der Staphylokokken-Nuclease geprüft.

Material und Methoden

1. Staphylokokken

Von Infektionen des Menschen entstammten die Stämme SAB* und H₂-H₆**, von euterkranken Kühen waren die Stämme B₁-B₆ und von Hautinfektionen des Hundes die Stämme C₁-C₆***. Diese Stämme wurden aus einer Anzahl von Staphylokokkenkulturen auf Grund ihrer Nucleaseaktivität ausgesucht. Die Staphylokokken wurden auf Nutrient-Agar⁺ mit Zusatz von 0,3-proz. Hefeextrakt⁺⁺ aufbewahrt.

¹ S. P. ELEK, *Staphylococcus pyogenes*, E. & S. Livingstone Ltd., Edinburgh und London 1959, S. 218.

² S. I. JACOBS, A. T. WILLIS u. G. M. GOODBURN, *Nature* [London] **200**, 709 [1963].

³ H. R. ELSTON u. D. M. FITCH, *Amer. J. clin. Pathol.* **42**, 346 [1964].

⁴ M. KORBECKI u. J. JELJASZEWICZ, *J. infect. Diseases* **115**, 205 [1965].

⁵ L. CUNNINGHAM, B. W. CATLIN u. M. PRIVAT DE GARILHE, *J. Amer. chem. Soc.* **78**, 4642 [1956].

⁶ M. ALEXANDER, L. A. HEPPLE u. J. J. HURWITZ, *J. biol. Chemistry* **236**, 3014 [1961].

⁷ R. HACHA u. E. FREDERICQ, *Biochim. biophysica Acta* [Amsterdam] **123**, 493 [1966].

⁸ H. TANIUCHI u. C. B. ANFENSEN, *J. biol. Chemistry* **241**, 4366 [1966].

⁹ P. CUATRECASAS, S. FUCHS u. C. B. ANFENSEN, *J. biol. Chemistry* **242**, 1541 [1967].

¹⁰ S. FUCHS, P. CUATRECASAS u. C. B. ANFENSEN, *J. biol. Chemistry* **242**, 4768 [1967].

* Von Prof. CATLIN, Marquette University, School of Medicine, Milwaukee, Wis./USA.

** Vom Hygiene-Institut der Universität Gießen.

*** Vom Institut für Hygiene und Infektionskrankheiten der Tiere der Universität Gießen.

2. Bestimmung der Nuclease-Aktivität

Die Auswahl der Nuclease-positiven Kulturen erfolgte auf einem DNase-Testmedium⁺⁺⁺. Für die Messung der Nuclease-Aktivität wurde Desoxyribonucleinsäure (DNA) entweder käuflich erworben^{****} oder nach der Methode von KAY et al.¹¹ aus Kalbsthymus hergestellt. DNA wurde in kochendem Wasser 15 Min. erhitzt und anschließend sofort im Eisbad abgekühlt. Die Messungen der Nuclease-Aktivität wurden im wesentlichen nach der Methode von ALEXANDER et al.⁶ ausgeführt. Die 1,25 ml Reaktionslösung setzten sich zusammen aus 0,625 ml der denaturierten DNA-Lösung (600 µg DNA/ml); 0,4 ml 0,2 M Tris-HCl-Puffer (pH 8,8), 0,125 ml 0,2 M CaCl₂ und 0,1 ml der zu untersuchenden Enzymlösung. Nach 30 Min. bei 37 °C wurde den Teströhrchen je 0,5 ml 5,6-proz. Perchlorsäure hinzugefügt und die Probe auf 3 ml mit Wasser aufgefüllt. Nach dem Zentrifugieren wurde die Extinktion des Überstands im Spektralphotometer⁺⁺⁺⁺ bei einer Wellenlänge von 260 nm abgelesen. Eine Nuclease-Einheit bewirkte unter den obigen Bedingungen innerhalb von 30 Min. einen Absorptionsanstieg von 1,0.

3. Bestimmung der Phosphomonoesterase-Aktivität

Die Aktivität bei der Phosphomonoesterase wurde nach der Methode von BESSEY et al.¹² gemessen. Die saure Phosphatase wurde in 0,1 M Acetat-Puffer, pH 5,5, der 0,1 mMol MgCl₂/ml enthält, bestimmt. Für die alkalische Phosphatase wurde 1 M Tris-Puffer, pH 9,5, verwandt.

4. Bestimmung weiterer Charakteristika der Staphylokokken

Der Koagulasenachweis wurde im Röhrchentest mit verdünntem Kaninchencitratplasma geführt¹⁴. Mannitvergärung wurde auf Nutrientagar* mit 1-proz. Mannit geprüft. Der pH-Indikator war Bromthymolblau.

Zur Hämolysebestimmung wurden Schaf- und Kaninchenerythrozyten dreimal in 0,14 M NaCl-Lösung gewaschen und als 2-proz. Suspension verwandt. Die Ablesungen erfolgten für das α-Hämolyse nach einer einstündigen Bebrütung bei 37 °C und die für das β-Hämolyse nach zusätzlicher einstündiger Aufbewahrung bei 4 °C.

Der Eigelfaktor wurde nach den Angaben von ALDER¹³ bestimmt. Der Kristallviolett-Test wurde nach einer von MEYER¹⁵ beschriebenen Methode ausge-

führt. — Die Lysotypie erfolgte mit den Phagen des „bovinen“ Satzes¹⁶. Die serologische Typisierung wurde mit den Faktorensereen a, b, c, e, f, h, i, k, l, m, o, p durchgeführt.

5. Produktion von Nuclease

Für die Herstellung des Mediums wurden 10 g Hefeextrakt** in 20 ml Wasser aufgelöst und 28 Std. gegen 1000 ml dest. Wasser bei 4 °C dialysiert. Diesem 1-proz. Hefediffusat wurden 10 g Casamino acids vitamin-free*** und 5 g Na₂HPO₄ zugesetzt. Je 100 ml dieses Mediums wurden in 1-l-Erlenmeyerkolben abgefüllt und autoklaviert. Zur Beimpfung diente eine Kultur, die vorher 6 Std. bei 37 °C in einem Medium gleicher Zusammensetzung bebrütet worden war. Die beimpften Kolben wurden dann 18 Std. bei 37 °C auf einer Rundschüttelmaschine bei 100 Umdrehungen/Min. inkubiert.

6. Reinigung der Nuclease

Zu dem durch Zentrifugieren (10 000 g 20 Min.) gewonnenen Kulturüberstand wurde bei Zimmertemperatur Ammoniumsulfat bis zu einer Sättigung von 80% (58 g/100 ml) zugesetzt. Die Mischung wurde dann 48 Std. bei 4 °C aufbewahrt. Bei der 80-proz. Sättigung mit Ammoniumsulfat wurden zwar nur 65% der Nuclease-Aktivität wiedergewonnen, dafür fielen aber auch nur etwa 5% der bei vollständiger Sättigung ausfallenden sauren Phosphatase mit aus. Alle folgenden Arbeiten wurden bei 4 °C ausgeführt. Das nach der Ammoniumsulfat-Ausfällung abzentrifugierte (10 000 g, 20 Min.) Präzipitat wurde in 50 ml dest. Wasser aufgelöst und 6 Std. unter zweifachem Wechsel gegen das je 100-fache Volumen dest. Wasser dialysiert. Eine längere Dialyse wurde vermieden, da trotz Vorbehandlung des Dialysierschlauches⁺ durch 10 Min. langes Kochen in 1-proz. NaHCO₃⁸ ein Aktivitätsverlust von etwa 10% und mehr auftrat. Die Nucleaselösung wurde nun mit einem gleichen Volumen 96-proz. Äthanol, das vorher auf -40 °C abgekühlt worden war, versetzt und anschließend 20 Min. bei 12 000 g zentrifugiert. Das Präzipitat wurde in 25 ml 0,3 M Ammoniumacetat, pH 5,7, aufgelöst und 24 Std. gegen jeweils das 50-fache Volumen dieser Lösung dialysiert (ein Wechsel). Die Nucleaselösung wurde 20 Min. bei 12 000 g zentrifugiert und der klare Überstand auf eine Cellulose-Phosphat-Säule⁺⁺ (1,5 · 18 cm) aufgetragen. Die Chromatographie wurde nach den Angaben von FUCHS et al.¹⁰ ausgeführt.

* DIFCO Laboratories, Detroit, Michigan/USA.

** Merck AG, Darmstadt.

*** BBL, Baltimore, Maryland.

**** Worthington, Biochem. Corp., Freehold, New Jersey.

***** PM Q II, Carl Zeiss, Oberkochen.

¹¹ M. E. R. KAY, N. S. SIMMONS u. A. L. DOUNCE, J. Amer. chem. Soc. **74**, 1724 [1952].

¹² O. A. BESSEY, O. L. LOWRY u. M. J. BROCK, J. biol. Chemistry **164**, 321 [1946].

¹³ W. C. ALDER, W. A. GILLESPIE u. G. HERDAN, J. Pathol. Bacteriol. **66**, 205 [1953].

¹⁴ G. HENTSCHEL, Vet. Med. Dissertation, Gießen 1967.

¹⁵ W. MEYER, Z. med. Mikrobiol. u. Immunol. **153**, 158 [1967].

¹⁶ W. BONIN, Vet. Med. Dissertation, Gießen 1966.

* DIFCO Laboratories, Detroit, Michigan/USA.

** Merck AG, Darmstadt.

*** DIFCO Laboratories.

⁺ Kalle AG, Wiesbaden-Biebrich.

⁺⁺ Whatman, W. u. R. Balston Ltd.

⁺⁺⁺ Bausch & Lomb Photometer, Spectronic 20.

7. Keimzahlbestimmung

Das Plattenverfahren¹⁷ und photometrische Bestimmungen bei 625 nm wurden angewandt.

8. Herstellung von Antiseren

Als Antigen diente eine durch Ammoniumsulfat angereicherte und gegen dest. Wasser dialysierte Nucleasepräparation der Stämme SAB, B₅ und C₃, die durch Verdünnung mit dest. Wasser auf eine Proteinkonzentration von 4 mg/ml eingestellt wurde. (Die jeweiligen spezifischen Nucleaseaktivitäten sind aus Tab. 2 zu ersehen.) Anschließend wurde Formalin in einer Endkonzentration von 0,4% hinzugefügt. Etwa 2,5 kg schwere Kaninchen wurden in Abständen von 5 Tagen insgesamt 5-mal geimpft. Vor der Applikation wurde die Antigenlösung mit einem gleichen Volumen FREUND'schen Adjuvans* vermischt. Bei den Nucleasepräparaten von Staphylokokken „humanen“ und „bovinen“ Ursprungs wurden bei der ersten Injektion 1 ml und bei den nachfolgenden 4 Injektionen je 2 ml der mit dem Adjuvans versetzten Antigenlösung i.m. eingespritzt. Bei den Nucleasepräparationen von Staphylokokken „caninen“ Ursprungs, die sich als besonders toxisch erwiesen, wurden bei den ersten beiden Injektionen je 0,2 ml der Antigen-Adjuvans-Mischung intracutan auf zwei Körperstellen verteilt eingespritzt. Bei der dritten Injektion wurden 0,4 ml, bei der vierten 0,6 und bei der fünften Injektion 1,0 ml subcutan injiziert. Vier Tage nach der letzten Injektion wurde mittels Herzpunktion Blut zur Serumgewinnung entnommen.

9. Nuclease-Neutralisationstest

Es wurden 0,5 ml chromatographisch gereinigter Enzymlösung mit 0,5 ml Antiserum 20 Min. bei 37 °C bebrütet. Danach wurde aus dieser Mischung 0,1 ml entnommen und auf Nuclease-Aktivität untersucht. Zum Vergleich dienten Enzymlösungen, die entweder mit bidest. Wasser oder dem „Normalserum“ an Stelle des Antiserums bebrütet worden waren. Das „Normalserum“ war den Kaninchen jeweils vor der ersten Impfung entnommen worden.

10. Immunelektrophorese

Die elektrophoretische Trennung** wurde bei 250 V, 50 mA, 120 Min. mit Veronal-Puffer, Ionenstärke 0,1, pH 8,6, durchgeführt¹⁸. Nach einer 24-stündigen Immunodiffusion wurden die Platten weitere 24 Stdn. in 0,14 M NaCl-Lösung gelegt, anschließend kurz gewässert und sodann unter Filterpapier bei 37 °C getrocknet. Die Proteine wurden mit Amidoschwarz¹⁸ angefärbt.

Zur Feststellung der Nucleasefraktionen in einem Parallel-Elektrophorogramm wurde mit DNase-Test-

agar überschichtet¹⁹ und 2 Stdn. später mit 1 N HCl überschwemmt. Daraufhin hob sich die Zone der depolymerisierten DNA gegen die präzipitierte hochmolekulare DNA klar ab. Zur Bestimmung der Hämolyse wurde mit einem Agar überschichtet, der in einem „Hämagglutinations-Puffer“*** gelöst war und 10% Schaffbluterythrozyten enthielt.

Ergebnisse

1. Charakterisierung der *S. aureus*-Stämme

Die verwendeten Nuclease-aktiven Stämme waren Koagulase-positiv und vergärten Mannit. Alle produzierten saure und alkalische Phosphatase. Darüber hinaus wurde eine Reihe anderer Merkmale bestimmt, die bezüglich der Herkunft der Staphylokokken von Bedeutung¹⁵ sein könnten (Tab. 1).

2. Bildung von Nuclease

Das Wachstum der Staphylokokken wurde in dem angereicherten Hefe-Diffusat mit ihrer Nucleasebildung verglichen, um den optimalen Zeitpunkt der Nucleasegewinnung zu bestimmen. Bereits 1 Stde. nach der Beimpfung des flüssigen Nährmediums

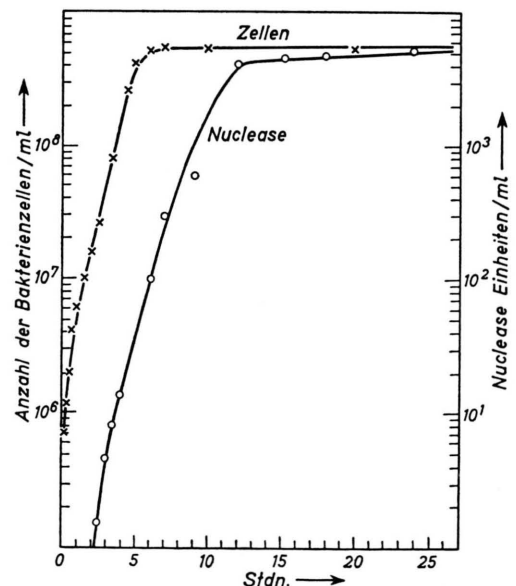


Abb. 1. Wachstumskurve und Nucleasebildung des Staphylokokkenstammes SAB.

¹⁷ G. G. MEYNELL u. E. MEYNELL, Theory and Practice in Experimental Bacteriology, Cambridge 1965.

* DIFCO Laboratories, Detroit, Michigan/USA.

** LKB-Produkte AB, Stockholm-Bromma, Schweden.

*** DIFCO Laboratories, Detroit, Michigan/USA.

¹⁸ W. MATTHAEUS, Zbl. Veterinärmed. 12 B, 133 [1965].

¹⁹ G. V. KEEFER u. H. BLOBEL, Amer. J. veterin. Res. 25, 1319 [1967].

Stämme	Hämo- lysine	Eigelb- faktor	Kristallviolett- Test	Serologische Typisierung	Phagen- typisierung
SAB	α	+	violett (negativ)	a, b, c, f, k, l, o, p	53, 75
H ₂	α	+	violett (negativ)	a, b, f, k, m	nicht typisierbar
H ₃	α	+	violett (negativ)	a, b, f, k, o	53, 54
H ₄	α	+	violett (negativ)	b, e, f, k	29
H ₅	α	+	violett (negativ)	b, f, o	nicht typisierbar
H ₆	α	+	violett (negativ)	b, f, k	52 A
B ₁	α, β	—	gelb (positiv)	a, b, f, k, l	102
B ₂	α, β	—	gelb (positiv)	Selbst- agglutination	102, 88 A
B ₃	α, β	—	gelb (positiv)	a, b, f, k	P 42 D, 88 A
B ₄	α, β	—	gelb (positiv)	b, f, o	S 1
B ₅	α, β	—	gelb (positiv)	b, f, k	102, 107, P 42 D, 129, 88 A, 42 D
B ₆	β	—	gelb (positiv)	f	102, P 42 D, 88 A
C ₁	α, β	+	weiß (positiv)	b, h, k	nicht typisierbar
C ₂	α, β	—	weiß (positiv)	b, f, k, l, o	nicht typisierbar
C ₃	α, β	+	weiß (positiv)	b, f, o	nicht typisierbar
C ₄	α, β	—	weiß (positiv)	l	nicht typisierbar
C ₅	α, β	—	weiß (positiv)	b, e, k, l	nicht typisierbar
C ₆	α, β	—	weiß (positiv)	Selbst- agglutination	nicht typisierbar

Tab. 1. Merkmale der bei der Untersuchung verwandten *S. aureus*-Stämme.

wurde Nuclease nachgewiesen. Die höchsten Nuclease-Konzentrationen waren nach etwa 16 Stdn. erreicht (Abb. 1). Die von anderen Autoren^{5, 6} angegebenen längeren Bebrütungszeiten sind demnach für die maximale Ausbeute nicht erforderlich. Außerdem tritt bei längerer Bebrütung in ausgedehntem Umfang Zellyse ein, und es steigt der Gehalt an alkalischer Phosphatase, die erst nach Aufzehrung des im Nährmedium enthaltenen Phosphates gebildet wird²⁰.

Zusätze von 10–1000 μg DNA/ml zum Nährmedium hatten keine Erhöhung der Enzymaktivität zur Folge. Ein ähnlicher Befund ist von MCCARTHY für Streptokokken-DNase erhoben worden²¹.

3. Reinigung der Nuclease

Nuclease wurde von allen Stämmen durch Ausfällung mit Ammoniumsulfat und Äthanol gewonnen. Damit wurde eine 20–30-fache Zunahme der spezifischen Aktivität erzielt. Diese Enzymanreicherungen enthielten sowohl Hämolysin als auch alkalische und saure Phosphatase. Eine weitere Reinigung wurde nur an den Anreicherungen des SAB, B₅- und C₃-Stammes auf einer Cellulose-Phosphat-Säule durchgeführt (Tab. 2). Die chromatographisch ge-

reinigte Nuclease war frei von Hämolysin und beiden Phosphatasen.

	SAB	B ₅	C ₃
Überstand	748	50	12
Ammoniumsulfat- ausfällung	3793	308	34
50% Äthanol ausfällung	9615	1355	135
Cellulose-Phosphat	86000	10440	1800

Tab. 2. Reinigung der Nucleasen des „humanen“ (SAB), „bovinen“ (B₅) und „caninen“ (C₃) Stammes. Die Zahlen in der Tabelle geben die Werte für die jeweilige spezifische Aktivität wieder.

4. Serologische Analysen

In Vorversuchen wurden im doppelten Agar-Diffusions-Test nach OUCHTERLONY²² deutliche Unterschiede zwischen den Alkohol-präzipitierten Nucleasen „humaner“ und „boviner“ Staphylokokken einerseits und der Nuclease „caniner“ Staphylokokken andererseits beobachtet (Abb. 2).

Diese Unterschiede wurden weiterhin immunoelektrophoretisch analysiert. Zunächst wurden die verschiedenen Reinigungsstufen der Nucleasen vom Stamm SAB untersucht. Dabei zeigte die durch Am-

²⁰ D. B. SHAH u. H. BLOBEL, J. Bacteriol. **94**, 780 [1967].

²¹ M. MCCARTHY, J. exp. Medicine **88**, 181 [1948].

²² Ö. OUCHTERLONY, Ark. Kem. Mineralog. Geol. Ser. B **26**, 1 [1948].

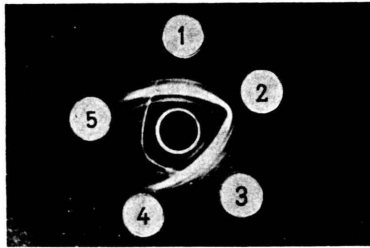


Abb. 2. Eine typische Ouchterlony-Platte aus der Versuchsserie mit deutlichen serologischen Unterschieden zwischen den Nucleasen von Staphylokokken „humaner“, „boviner“ und „caniner“ Herkunft. In der Mitte ist das Antiserum gegen Ammoniumsulfat-präzipitierte Nuclease des „humanen“ Stammes SAB. Peripher sind Alkohol-präzipitierte Nucleasen: In 1 und 3 vom homologen Stamm, in 2 vom „caninen“ Stamm C₃, in 4 vom „bovinen“ Stamm B₅ und in 5 vom „humanen“ Stamm H₂.

moniumsulfat angereicherte Nuclease mit dem homologen Antiserum eine Anzahl von Präzipitatbögen, während die chromatographisch gereinigte Nuclease mit demselben Antiserum nur noch eine einzige Linie ergab. Die Zugehörigkeit dieser Linie zur Nuclease wurde durch Überschichten eines Parallel-Elektrophorogramms mit DNA-haltigem Agar nachgewiesen (Abb. 3). Immunelektrophoretische Vergleichsuntersuchungen zwischen der Alkohol-präzipitierten Nuclease vom Stamm SAB mit den entsprechenden Enzymanreicherungen der anderen 5 „humanen“ Stämme (H₂–H₆) und der „bovinen“ Stämme (B₁–B₆) ergaben in keiner Kombination wahrnehmbare Unterschiede. Die durch Alkoholpräzipitation angereicherten Nucleasen aller untersuchten „caninen“ Stämme (C₁–C₆) verhielten sich dagegen unterschiedlich. Sie reagierten nur mit den Antiseren gegen die Nucleasen der „caninen“ Stämme, nicht jedoch mit den Antiseren der „humanen“ und „bovinen“ Stämme. Ein typisches Immunelektrophorogramm ist in Abb. 4 wiedergegeben.

Bei der Überschichtung mehrerer Parallel-Elektrophorogramme dieser Versuchsserie ließen sich keine Abweichungen in der elektrophoretischen Wanderungsgeschwindigkeit der Nuclease „caniner“ Staphylokokken gegenüber den Nucleasen „humaner“ oder „boviner“ Stämme erkennen.

Die sich aus der Immunelektrophorese ergebenden Unterschiede zwischen den Staphylokokken-Nucleasen „humaner“ und „boviner“ Stämme einerseits und den Nucleasen „caniner“ Stämme andererseits wurden mit den chromatographisch gereinigten Enzymen im Neutralisationstest weiter untersucht.

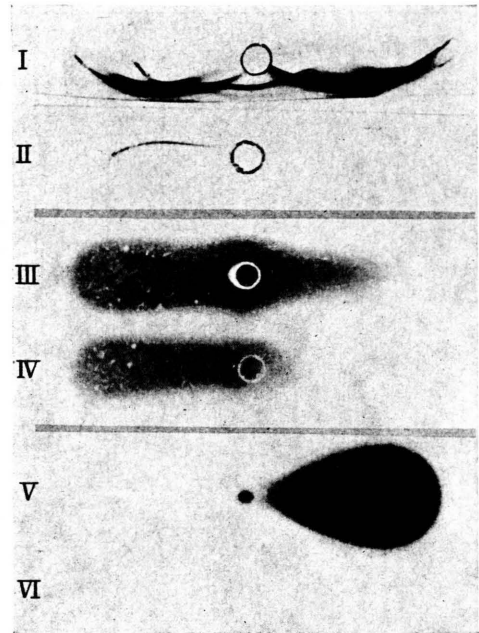


Abb. 3. Oben: Immunelektrophorese der Nuclease vom Stamm SAB, I nach Fällung mit $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (A-NU) und II nach chromatographischer Reinigung (Chr-Nu), jeweils mit Antiserum gegen A-NU. Mitte: Identifizierung der Nucleasefraktionen durch Überschichtung eines Parallel-Elektrophorogramms mit DNase-Testagar. III A-NU; IV Chr-Nu. Unten: Nachweis des Hämolyins durch Überschichten eines Parallel-Elektrophorogramms mit Schafblutagar. V A-NU; VI Chr-Nu.

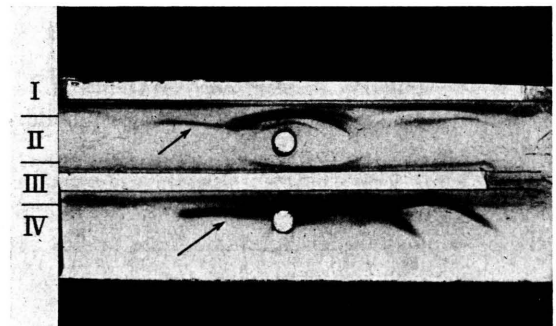


Abb. 4. Immunelektrophorese. I Antiserum gegen die Ammoniumsulfat-präzipitierte Nuclease des „caninen“ Stammes C₃, II Alkohol-präzipitierte Nuclease des „caninen“ Stammes C₃, III Antiserum gegen die Ammoniumsulfat-präzipitierte Nuclease des „humanen“ Stammes SAB, IV Alkohol-präzipitierte Nuclease des „humanen“ Stammes SAB. Die Pfeile zeigen die Lage der durch Überschichtung von Parallel-Elektrophorogrammen mit DNA-Agar identifizierten Nucleasen an.

Die Nucleasen stammten von dem „humanen“ Stamm SAB, dem „bovinen“ Stamm B₅ und dem „caninen“ Stamm C₃. Die SAB-Nuclease wurde vom homologen Antiserum vollständig, vom Antiserum gegen die B₅-Nuclease nahezu vollständig und vom Anti-

serum gegen die C_3 -Nuclease nicht gehemmt. Die B_5 -Nuclease wurde vom homologen Antiserum und dem Antiserum gegen SAB-Nuclease vollständig und vom Antiserum gegen C_3 -Nuclease nicht gehemmt. Die C_3 -Nuclease wurde nur von dem homologen Antiserum gehemmt (Abb. 5–7).

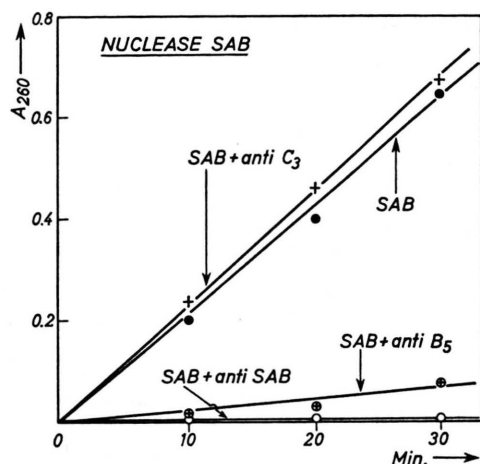


Abb. 5.

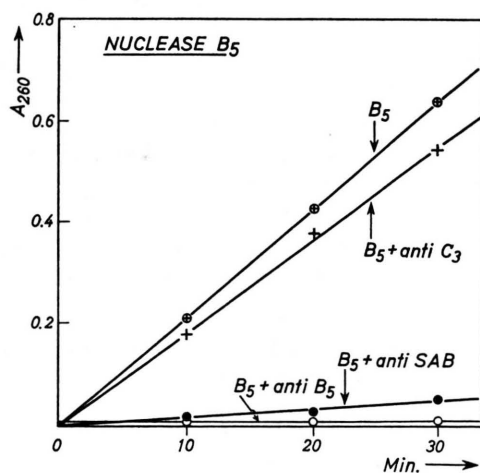


Abb. 6.

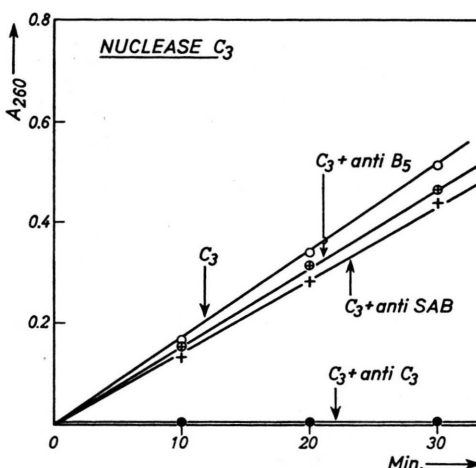


Abb. 7.

Diskussion

Bei den bisher über die Staphylokokken-Nuclease durchgeführten Untersuchungen war die Herkunft der zur Enzymgewinnung verwendeten Stämme nicht besonders berücksichtigt worden. Deshalb wurde in der vorliegenden Arbeit Nuclease von „humanen“, „bovinen“ und „caninen“ Stämmen gewonnen und die Staphylokokken im Hinblick auf ihre Herkunft biochemisch, serologisch und durch Phagentypisierung charakterisiert. Die Nucleasen wurden zunächst im doppelten Diffusionstest nach Ouchterlony und anschließend immuno-elektrophoretisch und im Neutralisationstest untersucht. Es ergaben sich bei gleichen elektrophoretischen Wanderungsgeschwindigkeiten deutliche serologische Unterschiede zwischen der Nuclease „humaner“ und „boviner“ Stämme gegenüber der Nuclease „caniner“ Stämme. Ob sich diese Unterschiede auch auf die Kinetik und die Struktur der Nucleasen bezieht, müßte in weiteren Untersuchungen geklärt werden.

Abb. 5–7. Neutralisations-Versuche mit den Nucleasen des „humanen“ (SAB), „bovinen“ (B_5) und „caninen“ Stammes (C_3) und den gegen diese Nucleasen gerichteten Antiseren.

Fräulein BRIGITTE SCHULZ danken wir für gewissenhafte technische Assistenz. Die Arbeit wurde mit finanzieller Unterstützung der Deutschen Forschungsgemeinschaft, Bad Godesberg, durchgeführt.