Zeitschrift: Mitteilungen aus dem Gebiete der Lebensmitteluntersuchung und Hygiene = Travaux de chimie alimentaire et d'hygiène

Herausgeber: Bundesamt für Gesundheit

Band: 5 (1914)

Heft: 5

Artikel: Versuche zur Herstellung von spezifisch wirkende Getreideantiseris für den Nachweis von Mehlverfälschungen. Erste Mitteilung

Autor: Thöni, J. / Thaysen, A.C.

DOI: https://doi.org/10.5169/seals-984212

Nutzungsbedingungen

Die ETH-Bibliothek ist die Anbieterin der digitalisierten Zeitschriften auf E-Periodica. Sie besitzt keine Urheberrechte an den Zeitschriften und ist nicht verantwortlich für deren Inhalte. Die Rechte liegen in der Regel bei den Herausgebern beziehungsweise den externen Rechteinhabern. Das Veröffentlichen von Bildern in Print- und Online-Publikationen sowie auf Social Media-Kanälen oder Webseiten ist nur mit vorheriger Genehmigung der Rechteinhaber erlaubt. Mehr erfahren

Conditions d'utilisation

L'ETH Library est le fournisseur des revues numérisées. Elle ne détient aucun droit d'auteur sur les revues et n'est pas responsable de leur contenu. En règle générale, les droits sont détenus par les éditeurs ou les détenteurs de droits externes. La reproduction d'images dans des publications imprimées ou en ligne ainsi que sur des canaux de médias sociaux ou des sites web n'est autorisée qu'avec l'accord préalable des détenteurs des droits. En savoir plus

Terms of use

The ETH Library is the provider of the digitised journals. It does not own any copyrights to the journals and is not responsible for their content. The rights usually lie with the publishers or the external rights holders. Publishing images in print and online publications, as well as on social media channels or websites, is only permitted with the prior consent of the rights holders. Find out more

Download PDF: 12.07.2025

ETH-Bibliothek Zürich, E-Periodica, https://www.e-periodica.ch

MITTEILUNGEN
AUS DEM GEBIETE DER
LEBENSMITTELUNTERSUCHUNG UND HYGIENE
VERÖFFENTLICHT VOM SCHWEIZ. GESUNDHEITSAMT

TRAVAUX DE CHIMIE ALIMENTAIRE ET D'HYGIÈNE
PUBLIÉS PAR LE SERVICE SANITAIRE FÉDÉRAL

ABONNEMENT: Schweiz Fr. 8. — per Jahrg. — Ausland Fr. 10. — oder M. 8. —.
Suisse fr. 8. — par année. — Etranger fr. 10. — ou M. 8. —.
Preis einzelner Hefte Fr. 1. 50 (Ausland M. 1. 50).
Prix des fascicules fr. 1. 50 (étranger M. 1. 50).
Jährlich 6—8 Hefte — 6 à 8 fascicules par année

BAND V — 1914 — HEFT 5

Versuche zur Herstellung von spezifisch wirkenden Getreideantiseris für den Nachweis von Mehlverfälschungen.

Erste Mitteilung.

Von Dr. J. THÖNI und Dr. A. C. THAYSEN.

(Aus dem Laboratorium des Schweiz. Gesundheitsamtes.)

Einleitung.

Im Anschluss an einige im hiesigen Laboratorium (1) ausgeführte Untersuchungen hatten wir uns im Jahre 1911 zur Aufgabe gestellt, den Wert des serodiagnostischen Verfahrens zum Nachweis von Mehlverfälschungen zu prüfen. Die Frage der Möglichkeit einer Herstellung von spezifisch wirkenden Antiseris aus dem Eiweiss der Getreidearten, bezw. aus Pflanzeneiweiss überhaupt, war damals schon von verschiedener Seite behandelt worden und zwar mit recht unbefriedigendem Ergebnis. Es soll hier nicht auf die Resultate der einzelnen sich auf diesem Gebiete betätigenden Forscher eingetreten werden. Eventuelle Interessenten verweisen wir auf die ausführliche Literaturzusammenstellung in dem Buche von Gohlke (2). Nur so viel sei bemerkt, dass, mit einer Ausnahme, alle diejenigen, denen die Herstellung von Antiseris gegen Getreideeiweiss gelang, die Unspezifität dieser Antisera hervorheben. Ein mit Weizenmehlextrakt hergestelltes Antiserum z. B. reagierte nach den Angaben von *Magnus* (3) ebenfalls mit Roggenmehlextrakt, ein Verhalten, das er auf die nahe Verwandtschaft der Gramineen unter sich zurückführt. *Relander* (4) ist der einzige, der die Anschauung einer absoluten Spezifität der Getreideantisera vertritt. Er will

ein Antiserum gegen Gersteneiweiss von so hoher Spezifität hergestellt haben, dass es ihm mit diesem gelingt, verschiedene *Gerstenvarietäten* zu differenzieren. Leider ist es aus seinem kurzen Aufsatze nicht möglich, seine Angaben zu kontrollieren. Wir möchten doch, gestützt auf unsere eigenen Untersuchungen, vorläufig ihre Richtigkeit bezweifeln. Nicht so, dass wir sie für theoretisch undenkbar halten — ganz im Gegenteil; was uns fraglich erscheint, ist, ob die Technik, die *Relander* bei der Gewinnung seiner Antigene benutzte, eine derart durchgeführte war, dass sie ein so eminentes Ergebnis ermöglichte. Es wird aus unseren Untersuchungen hervorgehen, mit wie grosser Schwierigkeit die Herstellung von gegen die Getreidearten unter sich spezifisch wirkenden Antigenen verknüpft ist. Wie viel mehr muss dieses denn der Fall sein, wenn man zu spezifischen Antigenen gegen verschiedene *Varietäten* einer und derselben Art gelangen will?

Die praktische Anwendung der serodiagnostischen Methode zum Nachweis von Mehlverfälschungen ist, soweit uns bekannt, nur von *Magnus* (3) versucht worden. Er versetzte ein von ihm hergestelltes Weizenantiserum, das ebenfalls mit Roggenantigen reagierte, mit so viel Roggenmehlextrakt, dass das Antiserum gegen weitere Zusätze davon unwirksam blieb. Mit einem so abgesättigten Serum konnte er Weizenmehl in Roggenmehl bis zu 3 % sicher nachweisen.

Eigene Versuche.

Die guten Erfolge, die *Magnus* bei seinen Untersuchungen zu verzeichnen hatte, liessen vermuten, dass seine Arbeitsmethoden vorteilhaft gewesen waren. Bei unseren ersten Versuchen zur Herstellung von spezifischen Getreideantiseris bedienten wir uns denn auch der von *Magnus* angegebenen Methodik, mussten sie aber, wie aus dem folgenden hervorgehen wird, bald verlassen, da sie sich als wenig zweckmässig erwies. Für unsere Versuche wählten wir die Getreidearten Roggen, Weizen, Gerste und Hafer. Wir bezogen die Körner aus Geschäften in Bern, befreiten sie sorgfältig von beigemischten Unreinheiten und mahlten sie in einer Handmühle, die nach jedesmaligem Gebrauch geputzt und ausgekocht wurde. Die erhaltenen Mehle wurden im Verhältnis 1 : 4 mit steriler physiologischer Kochsalzlösung unter Beigabe von einigen Tropfen Toluol während 18—24 Stunden bei Zimmertemperatur ausgelaugt und die Extraktionsflüssigkeit nach Ablauf dieser Zeit durch Filtration mittels ausgeglühter Kieselgur in absolut klarem Zustande erhalten. Ein nachträgliches Alkalischmachen der Mehlauszüge mit Natriumkarbonat, wie es *Magnus* vorschreibt, bewirkte meist — am kräftigsten bei den Haferauszügen — ein Trübwerden der Flüssigkeiten. In der Salpetersäure-Kochprobe wiesen die so hergestellten Auszüge von Roggen, Weizen und Gerste einen reichlichen Gehalt von Eiweiss auf, während solches bei den Haferauszügen nur in spärlicher Menge nachzuweisen war. Um Abzessbildung zu vermeiden, zogen wir im Gegensatz zu

Magnus vor, bei der Immunisierung der Tiere die intravenöse Applikationsweise anzuwenden und injizierten den Tieren — es waren für jede Getreideart 2 Tiere in Behandlung genommen — als Anfangsdosis je 1 cm³ des Mehlauszuges in die Ohrvene, bei den späteren, in Intervallen von 6 Tagen vorgenommenen Injektionen bis zu 3 cm³ steigend. Da nach der dritten Injektion gar keine bezw. nur Spuren von Antikörpern gebildet worden waren, mussten wir, falls wir die subkutane Impfung umgehen wollten, andere Mittel zu finden suchen, um den Tieren auf intravenösem Wege grössere Dosen von Eiweiss geben zu können. Unser erster Gedanke war, die Mehlauszüge in Vacuum einzuengen und so eine Konzentrierung der Eiweissstoffe zu bewirken. Wir zogen jedoch vor, das Getreideeiweiss mittels Ammoniumsulfat aus den Auszügen zu fällen und so «*Eiweissextrakte*», wie sie unten beschrieben sind, herzustellen.

Herstellung von Getreideeiweissextrakt.

Das wie oben erhaltene Mehl wird im Verhältnis 1:4 mit steriler physiologischer Kochsalzlösung versetzt, die Mischung gut durchschüttelt und unter Zusatz von etwas Toluol 18—24 Stunden stehen gelassen. Nach nochmaligem vorsichtigem Umschütteln, um die extrahierten Eiweissstoffe in der Flüssigkeit homogen zu verteilen, und kurzem Stehenlassen zum Absetzen des Mehles, wird die Extraktionsflüssigkeit mittels ausgeglühtem Kieselgur klar filtriert und mit chemisch reinem Ammoniumsulfat bis zu vollständiger Sättigung (ca. 78 %) versetzt. Sämtliches in der Flüssigkeit enthaltene Eiweiss fällt dabei aus und kann durch Absetzenlassen, Zentrifugieren und Pressen auf Ton in trockenem Zustande erhalten werden. Es hat sich dabei bewährt, den Presskuchen in noch ganz schwach-feuchtem Zustande vom Tonteller abzuheben und im Thermostat bei ca. 37° vollständig zu trocknen, da sonst zu viel Ammoniumsulfat an dem Eiweiss haften bleibt. Das in dieser Weise hergestellte Eiweiss wird, gelöst in steriler physiologischer Kochsalzlösung, meist in Verdünnungen 1:50 bis 1:100 zur Immunisierung verwendet. Auch alle sonst zu verwendenden Verdünnungen und Lösungen von Getreideeiweiss dürfen nur mit steriler physiologischer Kochsalzlösung hergestellt werden.

Mittels solcher Eiweissextrakte, die von den Tieren sehr gut vertragen wurden, konnte nun sowohl bei den Roggen- wie bei den Gersten- und Weizentieren reichliche Antikörperbildung hervorgerufen werden. Bei den Hafertieren dagegen war, selbst nach längerer Behandlung, mittels der Präzipitinreaktion keine Antikörperbildung nachzuweisen. Dass jedoch eine gewisse Immunität eingesetzt hatte, wenigstens bei dem einen Tier, lässt sich daraus schliessen, dass dieses Tier nach einer Behandlungsdauer von ca. 2 Monaten bei Einführung von 2,5 cm³ Hafereiweissextrakt in die Ohrvene unter sehr heftigen anaphylaktischen Erscheinungen zu Grunde ging.

Die Wertigkeit und Spezifität der in dieser Weise hergestellten Sera geben die folgenden Tabellen I und II wieder.

Tabelle I.

Wertigkeit der Getreideantisera.

Bezeichnung der Antisera	Homologes Eiweiss in Lösungen		
	1 : 500 1 cm³	1 : 2500 1 cm³	1 : 5000 1 cm³
Weizenserum «a» 0,2 cm³	2 mm³	3 mm³	3 mm³
Weizenserum «b» 0,2 cm³	3 mm³	3 mm³	3 mm³
Roggenserum «a» 0,2 cm³	6 mm³	10 mm³	6 mm³
Roggenserum «b» 0,2 cm³	4 mm³	7 mm³	4 mm³
Gerstenserum «a» 0,2 cm³	5 mm³	4 mm³	2 mm³
Haferserum «b» 0,2 cm³	0	0	0
Kontrolle: Normalkaninchenserum 0,2 cm³	0	0	0

Bemerkung: Zur Abmessung der ausgefallenen Präzipitatmengen dienten hier wie in allen späteren Versuchen die von *Thöni* (5) konstruierten Mellimeter, eine Art Trommsdorfsche Leukocytengläser, in deren eingeengten und in Teilstriche von je 1½ mm³ eingeteilten Teil das ausgefallene Präzipitat durch Zentrifugierung bei 1500 Touren während 5 Minuten eingepresst wird. Die Gläser werden nach Vermischen von Eiweisslösung und Antiserum während 5 Stunden bei 37° aufgestellt, das ausgefallene Präzipitat durch Schleudern, wie oben angegeben, in den eingeengten Teil der Mellimeter eingetrieben und dessen Volumen abgelesen.

Tabelle II.

Spezifitätsprüfung der Getreideantisera.

Bezeichnung der Antisera	Roggeneiweiss in Lösung		Weizeneiweiss in Lösung		Gersteneiweiss in Lösung		Hafereiweiss in Lösung	
	1:500 1 cm³	1:2500 1 cm³	1:500 1 cm³	1:2500 1 cm³	1:500 1 cm³	1:2500 1 cm³	1:500 1 cm³	1:2500 1 cm³
Weizenantiserum «a» 0,2 cm³	Spuren	Spuren	2 mm³	3 mm³	Spuren	Spuren	0	0
Roggenantiserum «a» 0,2 cm³	6 mm³	10 mm³	4 mm³	4 mm³	2 mm³	1 mm³	Spuren	Spuren
Gerstenantiserum «a» 0,2 cm³	2 mm³	2 mm³	2 mm³	2 mm³	5 mm³	4 mm³	0	0
Haferantiserum «b» 0,2 cm³	0	0	0	0	0	0	0	0
Kontrolle: Normalkaninchenserum 0,2 cm³ . .	0	0	0	0	0	0	0	0

Es mag auf den mit der serologischen Technik nicht Vertrauten einen etwas befremdenden Eindruck machen, dass die abgemessenen Präzipitatmengen sich in diesen beiden Tabellen nicht der Konzentration der respektiven Antigenlösungen proportional verhalten; so fielen z. B., wie Tabelle I zeigt, aus 0,2 cm³ Roggenantiserum «a» und 1 cm³ Roggeneiweisslösung (1 : 500) nur 6 mm³ Präzipitat aus, während aus 1 cm³ Roggeneiweisslösung (1 : 2500) 10 mm³ und nicht, wie man erwarten könnte, fünfmal weniger

als im ersten Falle gebildet wurden. Es steht dieses Verhalten, wie *Thöni* (5) nachgewiesen hat, mit dem Chemismus der Bindung von Antigen und Antikörper in Zusammenhang und ist in diesem Falle auf einen zu grossen Ueberschuss an Antigen in der Eiweisslösung, der den normalen Verlauf des Bindungsvorganges verhindert, zurückzuführen.

Die Tabelle II lässt deutlich erkennen, dass von einer Spezifität der hergestellten Antisera keine Rede sein konnte. Schaltet man das Haferantiserum, dem die Bezeichnung «Antiserum» von vorneherein abgesprochen werden muss, und die Hafereiweisslösung, weil zu wenig konzentriert [1]) von der Betrachtung aus, so erkennt man, dass alle die drei hergestellten Getreideantisera auch mit den heterologen Eiweisslösungen in Reaktion treten. Dabei scheinen Roggen und Weizen einander am nächsten verwandt, während Gerste offenbar dem Roggen entfernter steht, gibt doch das Roggenantiserum «a» (Tabelle II) mit Weizeneiweisslösung eine grössere Menge Präzipitat als mit Gersteneiweisslösung von der gleichen Konzentration.

Sollte ein solches Antiserum, wie etwa das von uns hergestellte Roggenantiserum, eine praktische Verwendbarkeit erlangen, müsste notwendigerweise eine Beseitigung der in ihm enthaltenen mit Weizen- und Gersteneiweiss reagierenden Antikörper vorgenommen werden. *Magnus* hatte, wie in der Einleitung erwähnt, dieses durch Absättigung des nicht spezifischen Antiserums mit heterologem Extrakt versucht und dadurch ein spezifisch wirkendes Antiserum erhalten. Wir nahmen uns vor, die Angaben von *Magnus* durchzuprüfen und versetzten zu diesem Zwecke unser Roggenantiserum mit einer Lösung von Weizeneiweiss, weil dieses, wie Tabelle II zeigt, von den heterologen Eiweissarten am kräftigsten mit dem Roggenantiserum reagierte.

Nach Tabelle II gibt 0,2 cm^3 Roggenantiserum «a» mit 1 cm^3 Weizeneiweisslösung (1 : 2500) 4 mm^3 Präzipitat. Demnach sollten aus 2 cm^3 Antiserum durch die zehnfache Menge Weizeneiweisslösung 40 mm^3 Präzipitat ausgefällt werden, während ein weiterer Zusatz von Eiweiss keine Präzipitatbildung mehr hervorrufen dürfte, wenn durch Zusatz der ersten Menge eine vollständige Bindung sämtlicher mit Weizeneiweiss reagierenden Antikörper des Roggenantiserums erlangt worden war. Um nun ein zu starkes Verdünnen des Antiserums zu vermeiden, versetzten wir dieses nicht mit 10 cm^3 einer Weizeneiweisslösung (1 : 2500), sondern mit 0,2 cm^3 einer Lösung (1 : 50) und fügten, um einen reichlichen Ueberschuss an Weizeneiweiss in dem Roggenantiserum zu haben, weitere 0,2 cm^3 hinzu. Nach 5 stündigem Aufenthalt im Thermostaten bei 37°, waren 40 mm^3 Präzipitat gebildet worden. Wir durften also annehmen, dass 0,2 cm^3 der dem Roggenantiserum zugesetzten Eiweisslösung für seine vollständige Absättigung genügt hätte und dass in dem jetzt offenbar spezifisch wirkenden Antiserum ein Ueberschuss an Weizeneiweiss vorhanden war. Um mit einem derart ab-

[1]) Spätere Prüfungen haben uns davon überzeugt, dass die für Hafereiweiss angesehenen Substanzen zum allergrössten Teil nicht native Eiweisskörper waren.

gesättigten Antiserum Mehlverfälschungen (Roggenmehl in Weizenmehl zu 1—2 und 5 %) nachzuweisen, wurde das Eiweiss wie oben angegeben, aus den zu prüfenden Mehlen ausgefällt. 50 g Mehl wurden mit ca. 200 cm³ steriler physiologischer Kochsalzlösung über Nacht ausgelaugt, die Extraktionsflüssigkeit klar filtriert und mit Ammoniumsulfat bis zur Sättigung versetzt. Das gewonnene Trockeneiweiss wurde zu 1 % in Kochsalzlösung gelöst und diese Lösung in klarfiltriertem Zustande zur Ausführung der Reaktion verwendet.

Zu je 2 cm³ einer solchen Weizeneiweisslösung, gewonnen aus Weizenmehl mit 1—2 bezw. 5 % Roggenmehlverfälschung, wurden 1,2 cm³ abgesättigten Roggenantiserums (1 cm³ Antiserum + 0,2 cm³ Weizeneiweisslösung 1 : 50) zugesetzt. Als Kontrolle dienten 2 cm³ einer 1 % igen Weizeneiweisslösung, versetzt mit 1,2 cm³ abgesättigtem Roggenantiserum. Nach 5stündigem Aufenthalt bei 37° war gebildet worden:

Tabelle III.

	2 cm³ einer 1 %igen Lösung von Weizeneiweiss mit			Kontrolle
	1 % Roggenverfälschung	2 % Roggenverfälschung	5 % Roggenverfälschung	2 cm³ 1 %ige Weizeneiweisslösung
1,2 cm³ abgesättigtes Roggenantiserum	4 mm³	7 mm³	15 mm³	2 mm³
Normalkaninchenserum 1 cm³	0	0	0	0

Obschon ein weiterer Zusatz von Weizeneiweiss zu dem abgesättigten Roggenantiserum gegen unsere Erwartung eine Reaktion bewirkt hatte und ein Präzipitat deshalb im Kontrollversuch der Tabelle III gebildet worden war, ist doch von dem mit Roggen verfälschten Weizeneiweiss aus dem abgesättigten Roggenantiserum so viel mehr Präzipitat ausgefällt worden, dass man unter Umständen an die Verwendung eines derartig abgesättigten Antiserums für den Nachweis von Mehlverfälschungen denken könnte. Was jedoch die *praktische* Anwendung eines solchen Antiserums sehr erschweren wird, ist ausser dem Ausfall des Kontrollversuchs, der bei jedem Ungeübten ein Gefühl der Unsicherheit zurücklassen muss, der grosse Aufwand an Zeit und Arbeit, den die Reaktion erfordert. Wir haben es daher vorgezogen, anstatt die Technik der Serumabsättigung durch weitere Versuche für die Praxis möglicherweise geeigneter zu gestalten, andere Wege einzuschlagen, um zu einem wirklich spezifischen Antiserum zu gelangen.

Im Folgenden geben wir unsere bis jetzt erhaltenen Resultate wieder. Sie bieten in ihrer Unvollkommenheit nur einen bescheidenen Beitrag zur Beleuchtung der Frage über die Brauchbarkeit der Serodiagnose für den Nachweis von Mehlverfälschungen, ermöglichen aber unserer Meinung nach ein zuverlässigeres Studium der serologischen Verwandtschaftsverhältnisse bei den Pflanzen, als dies bis jetzt geschehen konnte und besonders hierin erblicken wir die Berechtigung ihrer Publikation.

Versuche zur Herstellung spezifischer Eiweisskörper aus den Getreidearten Roggen, Weizen und Gerste.

Das Eiweiss, welches durch Auslaugen mit physiologischer Kochsalzlösung aus den Samen der Getreidearten Roggen, Weizen und Gerste erhalten werden kann, bildet keinen einheitlichen Körper, sondern besteht nach *Osborne* (6) aus wenigstens drei verschiedenen Proteinen: dem Gliadin bezw. Hordein, dem Leukocin und einer dritten Proteinsubstanz, die erst bei vollständiger Sättigung mit Ammoniumsulfat aus ihrer Lösung ausfällt. Das Gliadin ist in 70 %igem Alkohol leicht, in reinem Wasser und in Wasser mit wenig oder nicht hydrolysierten Salzen dagegen schwer löslich. Bei Gegenwart von reichlichen Mengen freier OH-Ionen ist es auch in Wasser leicht löslich. Es gehört nicht zu den koagulierbaren Eiweisskörpern. Das Leukocin, das wie das Gliadin bei den drei erwähnten Getreidearten vorkommen soll, koaguliert bei ca. 65° C und wird durch Halbsättigung mit Ammoniumsulfat aus seinen Lösungen gefällt, gehört also zu den sog. Globulinen. Es lag auf der Hand, dem Leukocin und möglicherweise dem Gliadin die Schuld an der Unspezifität unserer früheren Antisera zuzuschreiben, denn natürlich müssen Antisera, die mit einem Gemisch von Antigenen, wie es das verwendete Getreideeiweiss darstellte, hergestellt werden, gemeinsame Antikörper enthalten, also unspezifisch reagieren. Wir wollten uns durch den unten beschriebenen Versuch hierüber zu orientieren suchen.

Da das Leukocin als Globulin, und das Gliadin, weil in salzhaltigem Wasser unlöslich, beim Halbsättigen mit Ammoniumsulfat aus ihren Lösungen ausfallen, versetzten wir Roggenmehlextraktionsflüssigkeit, die in üblicher Weise durch Auslaugen von Roggenmehl mit physiologischer Kochsalzlösung gewonnen war, mit 39 % Am_2SO_4, der Menge, die zur Halbsättigung erforderlich ist. Die Flüssigkeit wurde hiedurch von ausfallendem Eiweiss getrübt. Nach kurzem Absetzenlassen wurde dieses Eiweiss, wie früher angegeben, in trockenem Zustande erhalten. Wir bezeichneten es als *Roggenglobulin*. Die halbgesättigte Extraktionsflüssigkeit wurde durch ausgeglühten Kieselgur filtriert und in absolut klarem Zustande mit Ammoniumsulfat gesättigt. Hierdurch konnte ein weiterer Eiweisskörper, das *Roggenalbumin*, erhalten werden.

Mit 1 %igen Lösungen dieser Eiweissstoffe wurden nun in gleicher Weise wie bei der Herstellung der ersten Getreideantisera zwei Kaninchen immunisiert. Nach vier, in Intervallen von 5 Tagen gegebenen intravenösen Injektionen enthielt das Serum des Globulintieres so viele Antikörper, dass 0,5 cm^3 davon mit 1 cm^3 Globulinlösung (1 : 300) eine Präzipitatmenge von 7,5 mm^3 bildete. Das Serum des Albumintieres wies nach gleicher Behandlung eine Präzipitatmenge von 10,5 mm^3 auf in 1 cm^3 Albuminlösung (1 : 300). Wir verwendeten in diesem, wie in unseren späteren Versuchen, diese Konzentration von Antigenlösung zur Feststellung der Titer unserer Sera, weil diese Stärke einer Eiweisslösung nach *Uhlenhuth* (7) in einfacher Weise und mit ziemlicher Genauigkeit abgeschätzt werden kann. Es hat sich nämlich

gezeigt, dass Eiweisslösungen (1 : 300) in der Salpetersäurekochprobe beim Aufkochen gerade noch von dem koagulierenden Eiweiss sichtbar getrübt werden, ohne dass es zu einer Ausflockung des Eiweiss kommt. In der folgenden Tabelle IV sind die Mengen von Präzipitat angeführt, die wir beim Zusatz dieser Antisera zu Lösungen von «Globulin»- und «Albumineiweiss» der drei Getreidearten Roggen, Weizen und Gerste erhielten.

Tabelle IV.

Art des Antiserums	Menge des zugesetzten Antiserums	Roggen-globulinlösung 1 : 300	Roggen-albuminlösung 1 : 300	Weizen-globulinlösung 1 : 300	Weizen-albuminlösung 1 : 300	Gersten-globulinlösung 1 : 300	Gersten-albuminlösung 1 : 300	Physiol. Kochsalzlösung
	cm^3	1 cm^3	1 cm^3	1 cm^3	1 cm^3	1 cm^3	1 cm^3	1 cm^3
Roggenglobulin-antiserum . .	0,5	7,5 mm^3	4,75 mm^3	0,75 mm^3	ca. 0,5 ^{8}	0	0	0
Roggenalbumin-antiserum . .	0,5	7,5 mm^3	10,5 mm^3	6,0 mm^3	2,25 mm^3	2,25 mm^3	Spur	0
Normalkanin-chenserum . .	0,5	0	0	0	0	0		0

Gegen alle Erwartung erwies sich, wie aus dieser Zusammensetzung zu entnehmen ist, das Globulinantiserum als das spezifischere der beiden Antisera, und es muss deshalb fraglich erscheinen, ob die als Leukocin bezeichnete Substanz, die, wie aus dem Folgenden hervorgehen wird, kein einheitlicher Körper sein kann, in den drei Getreidearten Roggen, Weizen und Gerste vorkommt.

Wir isolierten nun auch die «Globuline» und «Albumine» des Weizens und der Gerste und immunisierten[1]) je 2 Kaninchen mit diesen Eiweissstoffen. Leider gingen die beiden mit «Gerstenglobulin» behandelten Tiere an Anaphylaxie zu Grunde, so dass uns nur ein Gerstenalbumin-, ein Weizenglobulin- und ein Weizenalbuminserum zur Verfügung standen. Ihr Verhalten mit den verschiedenen Antigenlösungen ist in Tabelle V wiedergegeben.

Tabelle V.

Antiserum von:	Antiserum-menge	Weizen-globulinlösung 1 : 300	Weizen-albuminlösung 1 : 300	Gersten-globulinlösung 1 : 300	Gersten-albuminlösung 1 : 300	Roggen-globulinlösung 1 : 300	Roggen-albuminlösung 1 : 300	Physiol. Kochsalzlösung
	cm^3	1 cm^3	1 cm^3	1 cm^3	1 cm^3	1 cm^3	1 cm^3	
Weizenglobulin	0,5	20,25 mm^3	?	0	0	7,5 mm^3	4,5 mm^3	0
Weizenalbumin	0,5	?	6,5 mm^3	ca. 1 mm^3	0	Spur	3,75 mm^3	0
Gerstenalbumin	0,5	1,5 mm^3	0	Spur	26,5 mm^3	Spur	Spur	0
Normalkanin-chenserum .	0,5	0	0	0	0	0	0	0

[1]) Alle später behandelten Tiere haben wir einer Schnellimmunisierung unterworfen, um dadurch so weit als möglich anaphylaktische Erscheinungen auszuschalten. Wir impften die Tiere alle zwei Tage intravenös, wobei die Anfangsdosis 0,5, die Enddosis 5,0 cm^3 betrug. Die Methode hat sich gut bewährt und meistens zu sehr hochwertigen Antiseren geführt.

Auch in diesen Fällen war also durch die Ausschaltung des Leukocins keine höhere Spezifität der Antisera erlangt worden. Es schien ganz im Gegenteil, als ob auch hier die beim fraktionierten Ausfällen der Eiweisskörper zuerst ausfallende Fraktion das spezifischere Antigen darstelle. Ob nun die Fraktion bei allen drei Getreidearten der nahen Verwandtschaft wegen eine mehr oder weniger grosse Uebereinstimmung besitze, oder durch zweckmässige Gewinnung in einer für jede Art absolut spezifischen Form erhalten werden könnte, meinten wir durch geeignete Behandlung des Globulins feststellen zu können. So, wie es für die Immunisierung der Tiere zur Anwendung gekommen war, stellte es ein Rohprodukt dar, gewonnen aus dem Gemisch der Eiweisskörper in der Mehlextraktionsflüssigkeit durch Fällung mit Ammoniumsulfat, ohne nachträgliche Reinigung. Es enthielt in dieser Form zweifellos Spuren von Albuminen, herrührend teils von beim Ausfällen des Globulins mitgerissenen Albuminen, teils auch von der «Mutterlauge», da das gefällte Globulin in schwach feuchtem Zustande von dem Tonteller entfernt worden war. Dass solche Spuren von Albuminen auf den Ausfall der ausserordentlich empfindlichen Präzipitinreaktion einen Einfluss ausüben mussten, ist selbstverständlich, und wir nahmen uns deshalb vor, das Globulin zu reinigen.

Zur Verfügung standen uns ca. 8 g Gesamtweizeneiweiss, gewonnen durch vollständige Sättigung von Weizenextraktionsflüssigkeit und bestehend aus ca. 3 g Eiweiss und etwa 5 g Ammoniumsulfat, letzteres von anhaftender und eingetrockneter Mutterlauge herrührend. Die 8 g Roheiweiss wurden mit 200 cm^3 physiologischer Kochsalzlösung versetzt und die Flüssigkeit von dem ungelöst gebliebenen Teil klar abfiltriert. Die so gewonnene Eiweisslösung sollte nun mit 78 g Ammoniumsulfat versetzt werden, um aus dieser halb gesättigten Lösung das Globulin zu isolieren. Schon nach Zusatz von 19,5 g des Salzes trübte sich aber die Flüssigkeit intensiv durch ausfallendes Eiweiss, das in gewöhnlicher Weise isoliert werden konnte und die *Fraktion 1* darstellte. Aus der klar filtrierten Lösung fiel bei Zusatz von weiteren 19,5 g Ammoniumsulfat ein Eiweisskörper, *Fraktion 2*, aus. Die *Fraktion 3* erhielten wir beim Versetzen der von den Fraktionen 1 und 2 befreiten Eiweisslösung mit 19,5 g Ammoniumsulfat und die *Fraktion 4* beim Zusatz von weiteren 19,5 g zu der wiederum klar filtrierten Lösung. Die Eiweisslösung enthielt jetzt 78 g Ammoniumsulfat, stellte also eine halbgesättigte Lösung dar, aus der wir nicht einen, sondern *vier* Eiweisskörper isoliert hatten. Die Albumine, die noch in der Lösung enthalten waren, wurden durch vollständige Sättigung mit Ammoniumsulfat ausgefällt und stellten die *Fraktion 5* dar.

Gewogen ergab:

Fraktion 1:	ca. 0,7 g	Substanz,	welche nur zum Teil in physiologischer NaCl-Lösung löslich war.
» 2:	ca. 0,5 g	»	welche ziemlich vollständig löslich war.
» 3:	ca. 0,6 g	»	restlos und fast klar in Kochsalz löslich.
» 4:	ca. 0,25 g	»	» » » » » » »
» 5:	ca. 0,75 g	»	» » » » » » »
Zusammen	ca. 2,80 g	Substanz.	

Bei der Spezifitätsprüfung dieser einzelnen Fraktionen mit unseren Getreideantiseris wurden die in Tabelle VI niedergelegten Resultate erhalten.

Tabelle VI.

Antiserum von:	Antiserum-menge cm³	Lösungen von Weizeneiweiss (1 : 300)					Physiol. Kochsalz-lösung 1 cm³
		Fraktion 1 1 cm³	Fraktion 2 1 cm³	Fraktion 3 1 cm³	Fraktion 4 1 cm³	Fraktion 5 1 cm³	
Weizenalbumin	0,5	0	0	0	Spur	9,0 mm³	0
Roggenglobulin	0,5	0	0,75 mm³	ca. 2,0 mm³	ca. 3,0 mm³	4,5 mm³	0
Gerstenalbumin	0,5	0	Spur	1,5 mm³	1,5 mm³	0	0
Normalkaninchen-serum	0,5	0	0	0	0	0	0

Bei der fraktionierten Ausfällung verhielt sich das Roggenglobulin in vollkommen übereinstimmender Weise. Wir konnten wie beim Weizen aus dem Globulin vier Fraktionen isolieren. Die Albumine wurden als eine Fraktion, die Fraktion 5 gefällt. Wir geben in Tabelle VII die Spezifität der einzelnen Fraktionen des Roggeneiweisses wieder, so weit wir sie prüfen konnten.

Tabelle VII.

Antiserum von:	Antiserum-menge 1 cm³	Lösungen von Roggeneiweiss (1 : 300)					Physiol. Kochsalz-lösung 1 cm³
		Fraktion 1 1 cm³	Fraktion 2 1 cm³	Fraktion 3 1 cm³	Fraktion 4 1 cm³	Fraktion 5 1 cm³	
Weizenglobulin	0,5	Spur	7,5			4,5 mm³	0
Weizenalbumin	0,5	0	Spur			3,75 mm³	0
Roggenglobulin	0,5	1,5 mm³	12,5 mm³			4,5 mm³	0
Gerstenalbumin	0,5	Spur	Spur			Spur	0
Normal-kaninchenserum	0,5	0	0			0	—

Bei der Zerlegung des Gerstenglobulins sind wir in analoger Weise, wie bei den beiden anderen Getreidearten vorgegangen. Zirka 9 g Roheiweiss, die schätzungsweise aus 2 g Eiweiss und 7 g Ammoniumsulfat bestanden, wurden in 200 cm³ physiologischer Kochsalzlösung gelöst und daraus nach Klarfiltration die

1. Fraktion nach Zusatz von 39 g Am_2SO_4 entsprechend der 1. und 2. Fraktion bei Weizen,
2. Fraktion nach Zusatz von 58,5 g Am_2SO_4 entsprechend der 3. Fraktion bei Weizen,
3. Fraktion nach Zusatz von 78 g Am_2SO_4 entsprechend der 4. Fraktion bei Weizen,

4. Fraktion nach Zusatz von 156 g Am_2SO_4 entsprechend der 5. Fraktion bei Weizen gewonnen.

Das Verhalten dieser Fraktionen bei der Spezifitätsprüfung ist aus Tabelle VIII ersichtlich.

Tabelle VIII.

Antiserum von:	Antiserum-menge 1 cm³	Lösungen von Gersteneiweiss (1 : 300)				Physiolog. Kochsalz-lösung 1 cm³
		Fraktion 1 1 cm³	Fraktion 2 1 cm³	Fraktion 3 1 cm³	Fraktion 4 1 cm³	
Weizenglobulin	0,5	0	0	0	0	0
Weizenalbumin	0,5	0	0	Spur	6,0 mm³	0
Roggenglobulin	0,5	0	0	0	0	0
Gerstenalbumin	0,5	0	0	1,5 mm³	26,5 mm³	0
Normal-kaninchenserum	0,5	0	0	0	0	—

Ein Vergleich der Tabellen VI und VIII liess die Annahme berechtigt erscheinen, dass die Verwendung der Fraktionen 1 des Eiweisses der drei Getreidearten für die Immunisierung die Herstellung von spezifisch wirkenden Antiseris ermöglichen würden. Denn die Fraktion 1 des Gersteneiweisses reagiert nicht mit Weizenglobulinantiserum, das zweifellos Antikörper gegen Weizeneiweiss, Fraktion 1, enthält; und auch mit Roggenglobulinantiserum, in dem Antikörper gegen Roggeneiweiss, Fraktion 1, vorhanden sein müssen, gibt die erste Fraktion des Gersteneiweisses keine Reaktion. Wie bei Gersteneiweiss finden wir bei Weizeneiweiss, dass das Roggenglobulinantiserum, trotz seines Gehaltes an Antikörpern gegen Roggeneiweiss, Fraktion 1, nicht mit dem Weizeneiweiss, Fraktion 1, in Reaktion tritt, was doch der Fall sein müsste, wenn Weizen und Roggeneiweiss, Fraktion 1, identisch bezw. nahe verwandt wären. Es war das von uns hergestellte Roggeneiweiss, Fraktion 1, mit dem Weizenglobulinantiserum, unter Bildung von Spuren eines Präzipitats, in Reaktion getreten. Dass dieser Ausfall der Reaktion eher auf ungenügende Reinheit der ersten Roggenfraktion zurückzuführen, als in einer Identität dieser Fraktion mit der Fraktion 1 des Weizeneiweisses zu suchen war, schien uns nach dem Ausfall der Reaktion zwischen Weizeneiweiss, Fraktion 1, und Roggenglobulinantiserum mehr als wahrscheinlich. Da wir der Meinung waren, dass die Unspezifität durch anhaftende Spuren der höheren Fraktionen verursacht wurde, lösten wir die Fraktion 1 des Roggeneiweisses in 200 cm³ physiologischer Kochsalzlösung und glaubten dann, sie durch Zusatz der für ihre Ausfällung gerade erforderlichen Menge Ammoniumsulfat (19,5 g) von diesen Spuren befreien zu können. Der dadurch erreichte Effekt war ein ganz unerwarteter. Wir erhielten zwar bei Zusatz der 19,5 Am_2SO_4 einen Körper, dessen Menge jedoch in getrocknetem Zustande nur ungefähr die Hälfte der gelösten Fraktion 1 ausmachte. Der übrige Teil

war offenbar in Lösung geblieben. Als wir dann zu der klarfiltrierten Lösung weitere 11,5 g Am_2SO_4 hinzufügten, erhielten wir einen zweiten Körper, dem bei Wiederholung dieser Prozedur, wobei die verwendeten Ammoniummengen 19,0 und 28,0 g ausmachten, ein dritter und vierter Körper folgten. Was nunmehr an Eiweiss in der Lösung zurückblieb, konnte selbst nach vollständiger Sättigung nicht zum Ausfallen gebracht werden. Die klare Lösung wurde schwach opaleszierend, zu einer Ausflockung kam es jedoch nicht. Die vier erhaltenen Teilfraktionen waren, ihrer Reihenfolge nach genannt, die folgenden:

Fraktion 1α, nach Zusatz von 19,5 g Am_2SO_4 : ca. 1,2 g leicht und fast klar lösliche Substanz.

Fraktion 1β, nach Zusatz von 31 g Am_2SO_4 : ca. 0,5 g leicht und fast klar lösliche Substanz.

Fraktion 1γ, nach Zusatz von 50 g Am_2SO_4 : ca. 0,3 g leicht und fast klar lösliche Substanz.

Fraktion 1δ, nach Zusatz von 78 g Am_2SO_4 : ca. 0,1 g leicht und fast klar lösliche Substanz.

Die Fraktion 1α stellt eine schwarzbraune, gummiartige Substanz dar, die sich bei der Gewinnung von den übrigen Fraktionen abweichend verhält. Sie hat in feuchtem Zustande die Konsistenz eines weichharzigen Körpers, der sich auf Ton nur sehr ungenügend trocknen lässt. Die an ihr haftende Flüssigkeit wird nämlich nicht von dem Ton absorbiert, und ein Eintrocknen findet deshalb nur statt durch allmähliches Entweichen der Feuchtigkeit in die Luft. Dabei bleiben natürlich die in der Mutterlauge vorhandenen geringen Mengen der übrigen Fraktionen zurück und dringen nicht, wie es sonst der Fall ist, mit der Mutterlauge in den Ton ein. Diese und möglicherweise auch noch Spuren von Eiweisskörpern, die bei der Ausflockung mitgerissen werden, sind es jedenfalls, die die Eiweissreaktion der Fraktion 1α bedingen. Denn selbst konzentrierte Lösungen dieser Fraktion geben in der Salpetersäurekochprobe eine sehr schwache Eiweissreaktion, deren Intensität in keinem annehmbaren Verhältnis zu der gelösten Menge Substanz steht. Als Antigene für die Herstellung von Roggenantiseris konnten demnach nur die Fraktionen 1β, γ und δ in Betracht kommen. Sie sollten zur Feststellung ihrer Spezifität mit unseren Antiseris geprüft werden. Leider war aber der uns übrig bleibende Teil von Weizenglobulinantiserum durch Schimmelwucherung verdorben worden, so dass wir uns vor der Hand mit dem Gerstenalbuminantiserum begnügen mussten. Gegenüber diesem erwiesen sich die Fraktionen 1γ und δ als spezifisch. Die Fraktion 1β gab in Verdünnungen 1 : 300 pro cm^3 mit 0,5 cm^3 Antiserum Spuren von Präzipitat, und konnte deshalb, wie die Fraktion 1α, für die Immunisierung nicht verwendet werden.

Mit dem uns übrig gebliebenen Teil der Fraktion 1γ wurde nun die Immunisierung zweier Kaninchen angefangen. Gleichzeitig begannen wir die Aufarbeitung eines grösseren Quantums Roggen auf die Fraktion 1γ. Circa 8 kg ausgelesene Roggenkörner wurden durch Spülung mit einem kräftigen

Wasserstrahl von anhaftenden Verunreinigungen befreit. Nach Trocknen im Thermostaten bei 37° C kamen die Körner in die ausgekochte Handmühle. Aus dem erhaltenen Mehl wurde das Roheiweiss, wie bei der Herstellung der Eiweissextrakte, gewonnen. Leider mussten wir die Zerlegung dieses Roheiweisses aus unvorhergesehenen Gründen um beinahe ein halbes Jahr verschieben und bald auch die Immunisierung der Tiere wegen Mangel an Material einstellen. So bald es uns möglich war, wurde das erhaltene Roheiweiss im Gewichte von 35 g in Portionen zu je 9 g bezw. 8 g in je 200 cm³ physiologischer Kochsalzlösung gelöst und die Lösungen mittelst Kieselgur klar filtriert. Zu jeder Portion von 200 cm³ Lösung wurden 32 g Am_2SO_4 zugesetzt, welche Menge mit den in jeder Portion Roheiweiss angenommenen 7 g Am_2SO_4 gerade das für das Ausfallen der Fraktion 1 des Roggeneiweisses erforderliche Quantum Am_2SO_4 darstellte. Aus diesen vier viertelgesättigten Lösungen fielen im ganzen ca. 8 g Eiweiss der Fraktion 1 aus. Diese 8 g wurden in 800 cm³ Kochsalzlösung gelöst, die Lösung filtriert und zu der klaren Flüssigkeit 78 g Am_2SO_4 zugesetzt. Der ausfallende Körper, Fraktion 1α, wog circa 6,5 g. In der wiederum filtrierten Lösung blieben noch die Fraktionen 1β, γ und δ zurück. Fraktion 1β wurde durch Zusatz von weiteren 46 g Am_2SO_4 zum Ausfallen gebracht; ihr Gewicht betrug circa 1 g. Aus der klar filtrierten Lösung fiel nunmehr bei Zusatz von 78 g Am_2SO_4 die gewünschte γ-Fraktion aus. Ihr Gewicht wurde zu 0,56 g festgestellt. Um ganz sicher zu gehen, wollten wir das erhaltene Eiweiss durch nochmaliges Lösen und Ausfällen von anhaftenden Verunreinigungen befreien. Nach dem Obenstehenden sollte es in einer Am_2SO_4-Lösung von 16 % gelöst bleiben, um erst bei Erhöhung der Konzentration auf zirka 25 % auszufallen. Zu den 56 Centigramm γ-Eiweiss, die wir in 200 cm³ physiologischer Kochsalzlösung gelöst hatten, fügten wir deshalb 32 g Am_2SO_4. Dabei fiel gegen Erwarten ein Eiweisskörper von dunkelbrauner Farbe, in der Menge von circa 0,25 g aus. Wurde nun zu der fast farblosen Flüssigkeit weitere 18 g Am_2SO_4 hinzugesetzt und die Konzentration dadurch auf 25 % gebracht, so fiel der übrig bleibende Teil des Eiweisses als hellgelber Körper im Gewicht von zirka 0,25 g aus. Bei nochmaligem Lösen und Ausfällen verhielt sich dieses Eiweiss wie ein einheitlicher Körper, d. h. es fand erst nach Zusatz von 25 % Am_2SO_4 eine Ausfällung statt. Wir sind der Ueberzeugung, dass wir hier zum ersten Male *einen einzigen Eiweisskörper* aus dem Gemisch des Roggeneiweisses in reinem Zustande — serologisch gesprochen — vor uns gehabt haben.

Da die erhaltenen Mengen gereinigten γ-Eiweisses nicht für die Immunisierung von zwei frischen Kaninchen genügt hätten, und wir uns nicht mit der Behandlung eines einzigen Tieres begnügen wollten, haben wir die Immunisierung der beiden schon ein halbes Jahr vorher in Behandlung gewesenen Kaninchen mit einer 1 %igen Lösung des gereinigten γ-Eiweisses fortgesetzt, in der Hoffnung, dass die nach den früheren Einspritzungen im Serum der Tiere entstandenen Antikörper nach so langer Zeit wieder ver-

schwunden seien und dass die Wiederaufnahme der Behandlung, diesmal nur mit der einen Teilfraktion der ursprünglich verwendeten Fraktion 1 zu rascher Antikörperbildung nur gegen diese und nicht gegen ein Gemisch der beiden Teilfraktionen führen würde. Nach 4 Einspritzungen, die in Unterbrechungen von je einem Tag jeweilen erfolgt waren, gab das Serum des einen Tieres mit 1 cm³ gereinigter γ-Eiweisslösung (1 : 300) = 21 mm³ Präzipitat, während das Serum des andern Tieres, in analoger Weise verarbeitet, nur Spuren von Präzipitat aufwies.

Die Spezifitätsprüfung dieses γ-Roggenantiserums führte zu den in den Tabellen X und XI niedergelegten Resultaten.

Tabelle X.

Antiserum von:	Antiserummenge cm³	Lösung von der 1. Teilfraktion des γ-Eiweisses 1 : 300 1 cm³	Lösung von der 2. Teilfraktion des γ-Eiweisses 1 : 300 1 cm³	Lösung von β-Eiweiss 1 : 300 1 cm³	Physiologische Kochsalzlösung
γ-Roggeneiweiss	0,5	7,5 mm³	21,0 mm³	7,5 mm³	0
Normalkaninchenserum	0,5	0	0	0	—

Tabelle XI.

Antiserum von:	Antiserummenge cm³	Extraktionsflüssigkeit aus Weizenmehl 1 cm³	Extraktionsflüssigkeit aus Gerstenmehl 1 cm³	Extraktionsflüssigkeit aus Roggenmehl 1 cm³	Physiologische Kochsalzlösung
γ-Roggeneiweiss	0,5	ca. 1 mm³	0	17,0 mm³	0
Normalkaninchenserum	0,5	0	0	0	—

Die für diesen Versuch (Tabelle XI) verwendeten Mehlauszüge stellten wir uns in der Weise dar, dass wir 10 g des betreffenden Mehles, gewonnen aus ausgelesenen und gewaschenen Körnern, mit 90 cm³ physiologischer Kochsalzlösung versetzten. Am folgenden Tag wurde die Extraktionsflüssigkeit klar abfiltriert.

Wie aus Tabelle XI hervorgeht, war es auch dieses Mal nicht gelungen, ein einwandfrei spezifisches Roggenantiserum zu gewinnen. Wir zweifeln nicht daran, dass es unser mangelhaftes Vorgehen bei der Herstellung dieses Antiserums ist, dem die Schuld zugeschrieben werden muss. Hätten wir für die Immunisierung unvorbehandelte Tiere und ein event. noch ein bis zweimal gereinigtes γ-Eiweiss verwenden können, so wäre das Resultat, unserer Meinung nach, ein günstigeres geworden. Wir stützen uns in dieser Annahme auf den Verlauf der Reaktion bei γ-Roggenantiserum und der Lösung der

ersten Teilfraktion des γ-Eiweisses. Laut Tabelle X ist die bei dieser Reaktion gebildete Präzipitatmenge mit der von dem γ-Roggenantiserum und dem β-Roggeneiweiss gebildeten Menge übereinstimmend. Die erste γ-Fraktion und die β-Fraktion müssen demnach identisch sein. Mit anderen Worten, wir hatten für die ersten Einspritzungen ein γ-Eiweiss verwendet, das beträchtliche Mengen der als unspezifisch ausgeschaltenen β-Fraktion enthielt. Dass dieses bei ununterbrochener Behandlung der Tiere nicht ohne Einfluss sein kann, ist selbstverständlich. Dass aber die unspezifischen Antikörper sich bei unseren Tieren so lange im Blute erhalten hatten, war uns eine unangenehme Ueberraschung.

Schlussbemerkungen.

Die Versuche, die wir im Vorhergehenden beschrieben, haben unsere Annahme, dass man durch geeignete Gewinnung der Getreideantigene zu spezifischen Getreideantiseris gelangen kann, nicht entkräftet. Ein Vergleich der Tabellen II und XI lässt dieses deutlich erkennen. Von unserem mit dem Gesamtroggeneiweis hergestellten Roggenantiserum gaben 0,2 cm^3 mit 1 cm^3 Weizeneiweisslösung (1 : 500) 4 mm^3 Präzipitat, mit der gleichen Menge Gersteneiweisslösung 2 mm^3. Das γ-Roggenantiserum dagegen bildete bei Verwendung von 0,5 cm^3 mit 1 cm^3 Weizenextraktionsflüssigkeit, die, nach der Salpetersäurekochprobe schätzungsweise etwa 3 %, also 15 mal stärker war, als die in der Tab. II angeführte Weizeneiweisslösung, nur circa 1 mm^3 Präzipitat, während die Gerstenextraktionsflüssigkeit von dem γ-Roggenantiserum unbeeinflusst blieb. Kann man also durch sorgfältige Gewinnung der Antigene die Spezifität der Gedreiteantisera erhöhen, so wird es ohne Zweifel bei einer noch vollkommeneren Herstellungsweise dieser Körper gelingen, absolut spezifische Antikörper zu erhalten. Die Frage ist nur die, wie man vorzugehen hat, um dieses zu ermöglichen.

Nach unseren Erfahrungen wird man durch Verwendung eines absolut reinen γ-Roggeneiweisses zu einem spezifischen Roggenantiserum gelangen können. Die Veruche, die wir mit Gersten und Weizen ausgeführt haben, machen es wahrscheinlich, dass es auch hier eine Teilfraktion der Fraktion 1, oder möglicherweise die ganze Fraktion in gereinigtem Zustande sein wird, die das spezifische Antigen abgibt. In den beiden nachstehenden Tabellen XII und XIII sind die Resultate wiedergegeben, die wir mit einem Gersten- und Weizenantiserum erhalten hatten. Während bei der Herstellung des Gerstenantiserums nur die Fraktion 1 Verwendung fand, war zur Gewinnung des Weizenantiserums die Fraktion 1 und eine Teilfraktion der Fraktion 2, die wir für spezifisch hielten, benützt worden.

Wie eine Gegenüberstellung der Resultate der beiden Tabellen auf der nächstfolgenden Seite zeigt, erwies sich das Weizenantiserum als das weniger spezifische, was wohl auf die Verwendung dieser Teilfraktion von Fraktion 2 zurückzuführen sein dürfte.

Tabelle XII.

Verhalten des *Gerstenantiserums* bei der Spezifitätsprüfung.

Antiserum von:	Antiserummenge cm³	Lösung von Gersteneiweiss Fraktion 1 1 cm³	Extraktionsflüssigkeit aus Weizenmehl 1 cm³	Extraktionsflüssigkeit aus Roggenmehl 1 cm³	Physiolog. Kochsalzlösung 1 cm³
Gersteneiweiss Fraktion 1	0,5	ca. 60,0 mm³	Spur	0	0
Normalkaninchenserum	0,5	0	0	0	0

Tabelle XIII.

Verhalten des *Weizenantiserums* bei der Spezifitätsprüfung.

Antiserum von:	Antiserummenge cm³	Lösung von Weizeneiweiss Fraktion 1 1 cm³	Extraktionsflüssigkeit aus Roggenmehl 1 cm³	Extraktionsflüssigkeit aus Gerstenmehl 1 cm³	Physiolog. Kochsalzlösung 1 cm³
Weizeneiweiss Fraktion 1 und 2	0,5	30,0 mm³	7,5 mm³	1,5 mm³	0
Normalkaninchenserum	0,5	0	0	0	—

Natürlich darf auf solche mehr oder weniger begründete Vermutungen nicht abgestellt werden, und es sollte denn auch bei späteren Versuchen der unten beschriebene, etwas mühsame, aber zweifellos zum Ziel führende Weg sofort eingeschlagen werden. Enthalten die Getreidearten in ihren Körnern Gemische von Eiweissstoffen, so müssen zuerst diese Gemische in ihre Bestandteile zerlegt werden. Das Mittel hiefür dürfte nun in der fraktionierten Ausfällung mit Ammoniumsulfat gefunden sein. Nach unseren bisherigen Erfahrungen würde dabei die folgende Technik einzuschlagen sein.

Wegleitung zur Isolierung der spezifischen Teilfraktionen aus «Getreide-Roheiweiss».

Man löst das durch Extraktion mit steriler physiologischer Kochsalzlösung und durch vollständige Sättigung mit Am_2SO_4 gewonnene Gesamteiweiss etwa zu 4% in steriler physiologischer Kochsalzlösung. Zu dieser klarfiltrierten Flüssigkeit setzt man vorsichtig so viel Am_2SO_4 hinzu, dass eine Ausflockung von Eiweiss für das unbewaffnete Auge erkennbar wird. Der ausfallende Körper wird in gewöhnlicher Weise gesammelt und zu der filtrierten Flüssigkeit aufs neue Am_2SO_4 zugesetzt, bis wieder eine Ausflockung bemerkbar ist.

So wird fortgefahren bis sämtliches Eiweiss zum Ausfallen gebracht worden ist. Jede Fraktion wird nun in gleicher Weise, wie früher das Gesamteiweiss, in Teilfraktionen zerlegt, die erhaltenen Teilfraktionen wenn nötig ebenfalls fraktioniert gefällt, bis schliesslich Eiweisskörper gewonnen werden, die als Ganzes bei bestimmter Konzentration von Ammoniumsulfat aus ihren Lösungen ausfallen. Gegen jeden dieser reinen Eiweisskörper müssen nun Antisera hergestellt und diese mit Extraktionsflüssigkeiten der heterologen Getreidearten auf ihre Spezifität geprüft werden. Der oder die unter ihnen, deren Antisera gegen die heterologen Getreidearten unwirksam bleiben, dürfen als für die betreffende Getreideart eigen angesehen werden und können zur Herstellung spezifisch wirkender Antisera Verwendung finden. Selbstredend wird es für die Brauchbarkeit dieser Reaktion von Vorteil sein, wenn es sich herausstellen sollte, dass für jede Getreideart nicht ein einziger, sondern mehrere Eiweisskörper typisch sind, da hiedurch die Herstellung eines gewissermassen polyvalenten Antiserums möglich wird.

Man wird uns vielleicht bei dem oben geschilderten Verfahren entgegenhalten, dass die Eiweisskörper, die durch fraktionierte Fällung gewonnen werden, durch die häufige Behandlung mit Ammoniumsulfat geschädigt sind, und deshalb anders reagieren, als die nicht oder nur wenig mit Am_2SO_4 gefällten, mit denen sie ursprünglich identisch waren. Wir möchten im voraus hiergegen einwenden, dass Schädigungen von nativen Eiweisskörpern, wie wir sie sonst kennen, mit einer Unfähigkeit zur Antikörperbildung Hand in Hand gehen, was bei unseren fraktioniert gefällten Eiweissstoffen, selbst bei dem so oft gefällten γ-Roggeneiweiss nicht der Fall war. Uebrigens wird der Beweis für die vollständige Erhaltung der Eiweisskörper, selbst nach sehr häufigen Fällungen, leicht zu führen sein, sobald man im Besitze eines Antiserums ist, hergestellt mit einem in unserem Sinne des Wortes absolut reinen, also fraktioniert gefällten Eiweisskörper. Man braucht dann nur das Lösen und Fällen des gereinigten Eiweisskörpers öfters zu wiederholen und festzustellen, ob bei Zusatz von gleichen Mengen seines Antiserums vor und nach den Fällungen die gleichen Mengen Präzipitat aus gleich konzentrierten Eiweisslösungen ausfallen. Ist dieses der Fall, muss der Eiweisskörper durch den Fällungsvorgang unbeeinflusst geblieben sein.

Wird das serologische Verfahren zum Nachweis von Mehlverfälschungen für die Praxis brauchbar sein?

Sollte das serodiagnostische Verfahren zum Nachweis von Verfälschungen in Mehl, Kleie und anderen in Frage kommenden Nahrungs- und Futtermitteln gegenüber den jetzt angewendeten mikroskopischen Methoden aufkommen können, so müsste es in erster Linie leichter auszuführen sein als diese und geringere Mengen von Verfälschungsmaterial angeben können. Ersteres wird zweifellos der Fall sein, sobald man im Besitze hochwertiger, spezifisch reagierender Antisera ist. Man hat dann nur ein bestimmtes Quantum der zu prüfenden Substanz über Nacht mit steriler physiologischer Kochsalzlösung

auszulaugen, die Extraktionsflüssigkeit klar zu filtrieren und zu einer bestimmten Menge dieser Flüssigkeit eine näher anzugebende Menge Antiserum derjenigen Getreideart, auf deren Vorhandensein geprüft werden soll, zuzusetzen. Nach drei- bis fünfstündigem Stehenlassen des Gemisches von Antigen und Antikörpern bei 37° C und darauffolgendem Zentrifugieren könnte das Resultat erhalten werden. Besonders für Serienanalysen müsste sich ein solches Verfahren sehr gut eignen. Es lässt sich natürlich nicht bestreiten, dass die Herstellung der Antisera mit Schwierigkeiten verbunden sein wird und ihre Gewinnung daher dem Serologen überlassen sein müsste.

Ob man mit dem serodiagnostischen Verfahren geringere Mengen von Verfälschungen als durch die mikroskopischen Methoden wird nachweisen können, ist von zwei Faktoren abhängig. Erstens von der Hochwertigkeit des verwendeten Antiserums und zweitens von der Anzahl von spezifischen Teilfraktionen, mit denen das Antiserum hergestellt ist. Gesetzt der Fall, wir würden unser mit Fraktion 1 hergestelltes Gerstenantiserum zum Nachweis von Gerstenverfälschung in Roggenmehl verwenden. Tabelle XII gibt an, dass dieses Antiserum aus einem Kubikcentimeter einer Lösung (1 : 300) von Gersteneiweiss, Fraktion 1, circa 60 mm^3 Präzipitat ausfällt. Fraktion 1 stellt ungefähr ein Viertel des Gesamtgersteneiweisses dar, so dass eine 2 %ige Gerstenextraktionsflüssigkeit etwa 0,5 % Eiweiss der Fraktion 1 enthalten wird. Wir dürfen also erwarten, dass unser Antiserum aus 1 cm^3 dieser Extraktionsflüssigkeit 90 mm^3 Präzipitat bilden wird, aus $^3/_{100}$ Kubikzentimeter, was einer Verfälschung von 3 % entsprechen würde, etwa 2,5 mm^3. Nehmen wir an, dass es mit Hilfe der mikroskopischen Methoden möglich ist, noch Fremdzusätze in der Menge von 10 % nachzuweisen, so wäre also das serodiagnostische Verfahren diesen Methoden bedeutend überlegen. Ungünstiger liegen zwar die Verhältnisse bei dem Roggenantiserum, hergestellt mit der γ-Teilfraktion, die nur etwa 1 % des Gesamteiweisses ausmacht. Es ist aber sehr wahrscheinlich, dass sich auch bei Roggen und Weizen mehrere Teilfraktionen als spezifisch herausstellen werden, so dass die vollständige Ausarbeitung des serologischen Nachweises von Mehlverfälschungen sowohl für die Nahrungs- wie für die Futtermitteluntersuchung von Interesse sein dürfte.

* * *

Die Tatsache, dass das pflanzliche Eiweiss sich durch geeignete Behandlung in ganze Reihen von gut differenzierten Eiweisskörpern zerlegen lässt, könnte möglicherweise auf zwei weiteren Gebieten zu interessanten Beobachtungen führen. Wir denken hier an das Studium der serologischen Verwandtschaftsverhältnisse bei den Pflanzen, und an das Problem der Wirtswahl bei den pflanzlichen Parasiten, den Uredineen und Ustilagineen.

Sobald es sich im ersteren Falle nicht mehr um die Umgrenzung grösserer oder kleinerer Pflanzengruppen durch übereinstimmende Reaktionen handelt, sondern darum, eine einzige Pflanzenart, eine Varietät, von nahestehenden

Formen zu trennen, versagt die Serodiagnose in den meisten Fällen. Die Ursache hievon dürfte nach unserem Dafürhalten weniger in einer relativ geringen Spezifität des pflanzlichen Eiweisses liegen, als vielmehr dem Umstande zuzuschreiben sein, dass es aus einer grösseren Summe von Eiweisskörpern besteht. Ein Teil dieses Eiweisses wird nun bei nahestehenden Formen nicht als typisch angesehen werden müssen, ein anderer, je nach der Verwandschaft grösserer oder kleinerer, dagegen wohl. Wir möchten zur Stütze dieser unserer Annahme eine Beobachtung aus dem Tierreiche kurz anführen. Bekanntlich gelingt es durch Immunisierung von Kaninchen mit Menschenblut nicht, Antisera zu erhalten, die gegen Affenblut unwirksam sind. Immunisiert man hingegen, wie es *Uhlenhuth* (7) zuerst machte, Affen mit Menschenblut, so erhält man ein Antiserum, das nur mit Menschenblut, nicht aber mit Affenblut reagiert. Nimmt man an, dass bei den nahestehenden Tierformen Mensch und Affe nur ein Teil der in ihrem Blut enthaltenen Eiweisskörper für die betreffende Art typisch ist, so wird das erwähnte Verhalten leicht erklärlich. Immunisiert man nämlich Kaninchen mit allen im Menschenblut vorhandenen Eiweissstoffen, wie dies ja der Fall sein muss, wenn man das Blutserum als solches einspritzt, so werden im Blute der Kaninchen Antikörper sowohl gegen die für den Menschen typischen wie gegen die für Mensch und Affe gemeinsamen Eiweisskörper gebildet, weil beide dem Kaninchenblut artfremd sind. Dies trifft dagegen nicht zu, wenn man einem Affen Menschenblut injiziert. Hier sind die gemeinsam vorkommenden Eiweisskörper dem Affen natürlich nicht artfremd, sein Blut wird nur gegen die für den Menschen typischen Eiweissstoffe reagieren und deshalb nach der Immunisierung ein spezifisch wirkendes Antiserum abgeben. Da eine solche Gewinnung von spezifischen Antiseren im Pflanzenreich ausgeschlossen ist, bleibt uns gegebenen Falles nichts anderes übrig, als die für die zu prüfende Pflanzenart typischen Eiweisskörper durch fraktionierte Fällung zu isolieren und mit diesen spezifisch wirkende Antisera herzustellen.

Auch das eigentümliche Verhalten der oben erwähnten pflanzlichen Parasiten bei ihrer Wirtswahl könnte möglicherweise mit dem Vorhandensein zahlreicher, verschiedener Eiweisskörper in den Pflanzen im Zusammenhange stehen. In den meisten Fällen von Brand und Rostkrankheit werden ja nur ganz bestimmte Arten einer Familie von den Schädlingen befallen, während andere, nahestehende Formen sich als refraktär erweisen. Anstatt hier eine wirkliche Immunitätswirkung anzunehmen, liesse sich vielleicht denken, dass gewisse Eiweisskörper, die den Schmarotzern für ihre Entwicklung nötig sind, in diesen Fällen nicht vorhanden wären, und damit ein Aufkommen der Parasiten ausgeschlossen sei. Wir sind uns wohl bewusst, dass sich gewichtige Einwände gegen eine derartige Hypothese anführen lassen. Wir haben aber nicht unterlassen wollen, mit einigen Worten auf sie hinzuweisen, in Anbetracht der grossen Bedeutung, die sie haben könnte, wenn sie sich als richtig erweisen sollte.

Zusammenfassung.

Durch die im Vorhergehenden beschriebenen Versuche haben wir feststellen können: Dass das in den Getreidearten Roggen, Weizen und Gerste enthaltene Eiweiss durch fraktionierte Ausfällung mit Ammoniumsulfat in zahlreiche verschiedene Eiweisskörper zerlegt, und dass die Spezifität der gegen Roggen, Weizen und Gerste hergestellten Antisera bedeutend gesteigert werden kann, wenn nicht das Gesamteiweiss der betreffenden Getreideart, sondern ein oder einige der in ihr enthaltenen Eiweisskörper für die Immunisierung verwendet werden.

Literatur-Verzeichnis.

(1) *Thöni J.*, Beitrag zur Frage der Differenzierung von Pflanzenarten mittelst des biologischen Verfahrens (Komplementbindungsmethode). Mitteilungen aus dem Gebiete der Lebensmitteluntersuchung und Hygiene, 1910, Bd. I, S. 175.

(2) *Gohlke K.*, Die Brauchbarkeit der Serumdiagnostik für den Nachweis zweifelhafter Verwandtschaftsverhältnisse im Pflanzenreich. Verlag F. Grub, Stuttgart und Berlin, 1913.

(3) *Magnus W.*, Die Erkennung von Mehlverfälschungen durch die serumdiagnostische Methode. Landwirtschaftliche Jahrbücher, Bd. XXXVIII, Ergänzungsband V, 1909.

(4) *Relander Lauri Kr.*, Kann man mit der Präzipitinreaktion Samen verschiedener Pflanzenarten und Abarten unterscheiden? Centralbl. f. Bakt., Abt. II, Bd. XX, 1908.

(5) *Thöni J.*, Die Verwendung der quantitativen Präzipitinreaktion bei Honiguntersuchungen. Mitt. a. d. Gebiete d. Lebensmitteluntersuchung u. Hygiene, 1911, Bd. II, S. 80.

(6) *Osborne Th. B.*, Abderhaldens-Biochemische Arbeitsmethoden, 1910, Bd. 2.

(7) *Uhlenhuth*, Verhandlung der 77. Versammlung deutscher Naturforscher und Aerzte in Meran 1905.