

E11

XIIth European Meeting of Meat Research Workers
at Sandefjord Aug. 14. - 19, 1966

Immunologische Eigenschaften
einiger wasserlöslicher Muskelweiße

H.-J. Sinell

Institut für Lebensmittelhygiene
der Freien Universität Berlin

H.-J. Sinell:

On the immunological properties of some water soluble
muscle proteins

Sarcoplasmic proteins from beef and horse muscle extracted by dist. water and phosphate buffer were fractionated by gel filtration with Sephadex G-75 and G-100 respectively. The immunological properties of two components were investigated by means of precipitin tests, immunisation of rabbits, and immune electrophoresis.

There was one main fraction which contained a few proteins. One of them seemed to be similar to serum albumin. Antisera against this fraction had animal species specificity and could be absorbed with homologous serum albumin.

Another main fraction consisted of several components with lower molecular weight i.e. myoglobin. With this fraction rabbits could be immunized too. Antisera against this fraction precipitated only sarcoplasmic proteins but not serum proteins of the homologous animal species. Animal species specificity of the myoglobins could not be detected except by means of immune electrophoresis. Furthermore this second fraction was shown to contain antigens obviously being common to cattle and horse.

Die biochemischen Eigenschaften der für technologische Prozesse außerordentlich wichtigen fibrillären Muskeleiweiße sind bereits eingehend untersucht. Recht wenig bekannt ist dagegen über die wasserlöslichen Muskeleiweiße, die sog. "Sarkoplasma-Proteine". Man faßte sie früher als "Myogene" auf, auch das "Globulin X" gehört hierher. Neuere Untersuchungen zeigen, daß es sich bei diesen Eiweißen u.a. um ein Gemisch verschiedener Enzyme handelt, die inzwischen zum großen Teil näher charakterisiert worden sind (Beisenherz u.a. 1953).

Mit Anwendung neuerer Methoden zur Fraktionierung von Proteingemischen erwies sich auch der wasserlösliche Anteil der Muskeleiweiße als recht heterogen zusammengesetzt. Besonders die Gel-Filtration ermöglichte eine weitestgehende Auftrennung des Gesamtextraktes. Giles (1965) hat kürzlich versucht, die in Rindersarkoplasma ermittelten Proteinfractionen mit den aus früheren Arbeiten bekannt gewordenen Einzelisolierungen definierter Proteine (vornehmlich verschiedene Enzyme) in Beziehung zu setzen.

Zur Charakterisierung der verschiedenen wasserlöslichen Muskeleiweiße wurden bisher die konventionellen Daten der biochemischen Analyse herangezogen. Sie gestatteten in Einzelfällen die Feststellung bestimmter Speciesunterschiede, durch die die Sarkoplasmaproteine verschiedener Tierarten gegeneinander abgegrenzt werden können (Giles 1962, Thompson 1960, 1961, 1962).

Wenn also schon die biochemische Untersuchung tierartlich in diesen Proteinen gebundene Unterschiede nachweist, so liegt die Vermutung nahe, daß dies durch die immunologische Analyse noch deutlicher dargetan werden kann. Zwar wurden Muskelgesamtextrakte in nativer oder auch modifizierter Form schon oft für Immunisierungszwecke verwendet, doch sind die immunologischen Eigenschaften definierter Muskelproteine bisher nur selten untersucht worden.

Unter den Strukturproteinen wurde das Myosin als Antigen zur Herstellung spezifischer Antiseren benutzt (Szent-György u. Holtzer 1960). Außerdem wurden auch die immunologischen Eigenschaften des Myoglobins untersucht (Kesztyüs u. Várterész 1945, Kendrew u. Mitarb. 1954). Immunelektrophoretische Untersuchungen an Muskeleiweißen ergaben ebenfalls Speciesunterschiede (Durand u. Schneider 1962 a u. b). Diese Untersuchungen wurden allerdings an Gesamtextrakten und nicht an einzelnen Fraktionen ausgeführt. Sie lassen bereits erkennen, daß bei den wasserlöslichen Muskelproteinen auch in antigen-analytischer Hinsicht einige differente Fraktionen unterschieden werden müssen.

Im Verlaufe unserer Untersuchungen über die Identifizierbarkeit verschiedener Proteine mittels immunologischer Methoden schien es uns gerechtfertigt, auch die immunologischen Eigenschaften einiger Muskeleiweißfraktionen ergänzend zu den bereits bekannten biochemischen Daten zu untersuchen.

Methodik

A. Fraktionierung von Muskeleiweißen

Als Ausgangsmaterial für die Herstellung der Extrakte diente fett- und sehnenfreie Skelettmuskulatur von Rind und Pferd. Die Muskulatur wurde in schlachtwarmem Zustand entnommen, soweit erforderlich von Fett- und Bindegewebe befreit, im Fleischwolf zerkleinert und dann nach verschiedenen Verfahren extrahiert.

1. Wässrige Extraktion nach U. Barten 1965

Das zerkleinerte Fleisch wurde mit dest. Wasser übergossen, über Nacht im Kühlschrank extrahiert und anschließend in der Kühlzentrifuge bei 0-20° C zentrifugiert. Der Überstand wurde filtriert und dann lyophilisiert. Das Lyophilisat wurde bis zur Fraktionierung über Sicapent^(R) im Exsikkator aufbewahrt. Zur Auftrennung wurde es bis zu einer Eiweißkonzentration zwischen 4,5 und 12,6 g% in Wasser gelöst. Die Eiweißbestimmung erfolgte nach Lowry 1951. Für die Gel-Filtration wurde Sephadex G-75, new bead form, Pharmacia Uppsala, Schweden, verwendet. Das pulverförmige Material wurde in Wasser aufgeschwemmt und verblieb zum Quellen eine Nacht im Kühlschrank. Durch mehrmaliges Waschen und Dekantieren wurden die sehr feinkörnigen Partikel entfernt. Das Gel wurde dann in ein durch Wasserkühlung

auf 13-15° C temperiertes doppelwandiges Chromatographierohr verbracht (Durchmesser 25,4 mm, Länge 450 mm). Auf die so vorbereitete Säule wurden 5 ml Extrakt gegeben. Die Elution erfolgte mit Wasser bei einer Durchflußgeschwindigkeit von 0,2 ml·min⁻¹. Insgesamt wurden bei jeder Fraktionierung mindestens 60 Fraktionen zu je 4 ml in KPG-Röhrchen mit einem Fraktionssammler der Fa. Bender & Hobein aufgefangen.

In jeder Fraktion wurde der Eiweißgehalt und der nach dem α -Verfahren ermittelte Präzipitin-Titer gegenüber verschiedenen präzipitierenden Anti-Seren bestimmt. Das Auftreten eines rötlichen Farbtones wurde bei den entsprechenden Fraktionen registriert.

Aus einer Reihe von Auftrennungen wurden diejenigen Fraktionen ausgewählt, die eine Präzipitation mit Anti-Rinder-serum zeigten. Sie wurden vereinigt, lyophilisiert und als Antigene für Immunisierungszwecke verwendet (Antigen F I).

2. Extraktion mit Pufferlösungen

Die Behandlung erfolgte wie unter 1.), jedoch wurde die Extraktion der Muskulatur mit 0,04 M K-Na-phosphat-Puffer pH 7,4 vorgenommen. Die Extrakte wurden lyophilisiert und zur Fraktionierung mit einem Eiweißgehalt von 9,5 g% wiederum in Mengen von 5 ml auf die Säule verbracht. Diese war zuvor mit dem durch mehrere Tage hindurch in der genannten Pufferlösung äquilibrierten Sephadex G-75 beschickt worden. Mit dem gleichen Puffer erfolgte auch die Elution. Durchflußgeschwindigkeit und Fraktionsmenge waren die gleichen wie unter 1.). Von den mit Puffer hergestellten Fraktionierungen wurden ebenfalls wie unter 1.) Antigene zur Immunisierung gewonnen (Pferd PF I). Die Fraktionen des zweiten Peaks, der sich an die F I- (bzw. PF I-)Fraktion anschloß, wurden ebenfalls vereinigt und als PF II bezeichnet. Diese Fraktionen reagierten nicht mit Anti-Serum-Seren, jedoch zeigten sie eine positive Reaktion gegenüber Anti-Seren gegen alkoholgefällte Sarkoplasma-Proteine (Manteufel und Tomioka 1924).

Weitere Fraktionierungen erfolgten nach der von Giles 1965 angegebenen Methode. Hierbei wird eine Vorfraktionierung in einer 20 x 2 cm Säule über Sephadex G-25 vorgenommen, an die sich dann eine zweite Fraktionierung des lyophilisierten Protein-Peaks, also der eigentlichen Sarkoplasma-Proteine, anschließt. Diese findet über Sephadex G-100 in einer 150 x 1 cm Säule statt.

B. Immunologische Untersuchung

1. Präzipitation

Als präzipitierende Seren wurden verwendet:

- Anti-Rinderserum (Anti-RS),
- Anti-Pferdeserum (Anti-PS),
- Anti-Rinderserum-Albumin (Anti-RSA),
- Anti-Rind FI,
- Anti-Pferd PF I,
- Anti-Rind PF II,
- Anti-Pferd PF II,

Zur Präzipitation wurden die Seren mit den entsprechenden Antigen-Lösungen in Röhrchen von 3 mm lichter Weite und 30 mm Länge überschichtet. Als Titer der jeweiligen Reaktion wurde diejenige Antigen-Verdünnung bezeichnet (bezogen auf Eiweißgehalt nach Lowry), die mit dem betreffenden Antiserum eine eben noch sichtbare Fällung erkennen ließ.

2. Immunisierung

Jeweils zwei Kaninchen wurden mit Material der Fraktionen F I, PF I bzw. PF II unter Verwendung von FREUND-schem Adjuvans immunisiert. Die Gesamtdosis betrug 34 mg Antigen / Tier und verteilte sich wie folgt:

- | | |
|---|-------|
| 1. Injektion intracutan | 4 mg |
| 2. Injektion (15.Tag nach 1.Injektion) subcutan | 10 mg |
| 3. Injektion (16.Tag nach 1.Injektion) intravenös | 10 mg |
| 4. Injektion (17.Tag nach 1.Injektion) intravenös | 10 mg |

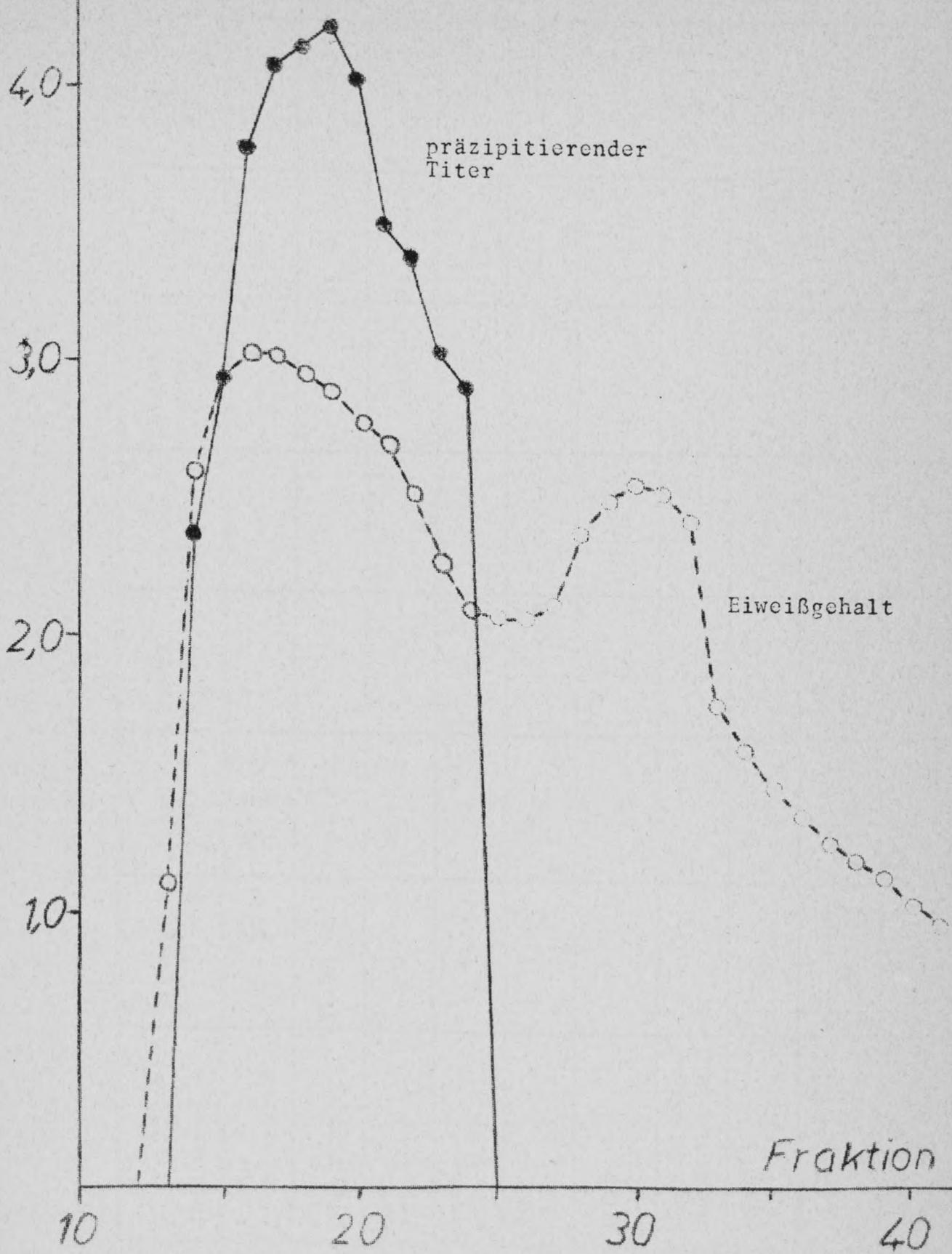
Nach Beendigung der Immunisierung wurden die Kaninchen entblutet und das Serum lyophilisiert und in evakuierten Ampullen im Kühlschrank aufbewahrt.

3. Immunelektrophorese

Die Immunelektrophorese erfolgte mit einem Gerät der Fa. LKB-Produkter AB Stockholm nach den Arbeitsanweisungen dieser Firma. Hierbei werden die Antigene eine Stunde bei 250 V und 50 mA im Agargel elektrophoretisch aufgetrennt. Durch anschließende Diffusion des Antisera gegen die Antigene bilden sich Präzipitate, die ungefärbt oder auch gefärbt betrachtet werden können.

log mg % Eiweiß

→ log Titer



Präzipitierende Titer verschiedener Sarkoplasma-Proteinfractionen gegen homologes Anti-Serum-Serum (Pferd).

Präzipitierende Titer im Röhrchenversuch

Antigen Antiserum	Pferde- serum	Pferd PF I	Pferd PF II	Rinder- serum	Rinder serum- Albumin	Rind F I	Rind PF II
Anti- Pferdeserum	1:64 000	1:32 000	-	-	-	-	-
Anti- Pferd PF I	1:64 000	1:64 000	-	-	-	1: 8 000	-
Anti- Pferd PF I	1:64 000	1:32 000	-	-	-	1: 4 000	-
Anti- Pferd PF II	-	-	1: 64 000	-	-	-	1: 8 000
Anti- Pferd PF II	-	-	1:256 000	-	-	-	1: 32 000
Anti- Rinderserum	-	-	-	1:128 000	1:128 000	1: 4 000	-
Anti-Rinder- serum-Albumin	-	-	-	1: 32 000	1:256 000	1:32 000	-
Anti- Rind F I	-	-	-	1: 64 000	1: 64 000	1:32 000	-
Anti- Rind PF II	-	-	1:256 000	-	-	-	1:128 000
Anti- Rind PF II	-	-	1:256 000	-	-	-	1: 64 000

Ergebnisse und Diskussion =====

Die Abbildung zeigt die Verlaufskurven für den Eiweißgehalt bei einer mit Puffer ausgeführten Fraktionierung von Pferde-Muskelextrakt. Daneben sind die präzipitierenden Titer der einzelnen Fraktionen gegen Anti-Pferdeserum-Serum mit eingetragen. Man erkennt, daß mehr als die Hälfte der gewonnenen Fraktionen mit diesem Serum reagiert. In diesen Muskeleiweiß-Fraktionen finden sich offenbar also die gleichen Antigen-Determinanten wie in den homologen Serum-Eiweißen.

Die aus den Muskeleiweißlösungen isolierten Fraktionen F I sowie PF I und II und verschiedene andere Antigene wurden zunächst im Röhrchenversuch auf eine Präzipitation überprüft. Im positiven Falle wurde die Reaktion bis zum Endpunkt austitriert. Die Ergebnisse sind in einer Tabelle zusammengefaßt, wobei die Titer mit angegeben sind.

Zunächst fällt im oberen linken Teil der Tabelle auf, daß eine kreuzweise Reaktion zwischen den Anti-Muskeleiweiß (Pferd PF I)- und den Anti-Serum-Seren stattfindet. Die Titerunterschiede sind nur gering. Die entsprechenden Reaktionen bei Rind weisen größere Titerunterschiede auf, die möglicherweise auf die hier angewendete andere Fraktionierungsmethode zurückzuführen sind. Die Muskelfraktion F I vom Rind reagiert geringer aber doch deutlich mit den heterologen Anti-Pferd-Seren. Inwiefern dennoch eine tierartlich gebundene Spezifität einzelner Komponenten besteht, ergab sich erst durch die immunoelektrophoretische Kontrolle, die auch die vermeintlich unspezifischen Reaktionen der PF II-Fraktionen aufklärte.

Auffällig ist, daß ein spezifisch gegen Rinderserum-Albumin-gerichtetes Serum die F I-Fraktion mit eben dem gleichen Titer fällt wie Rinderserum. Umgekehrt fällt das Anti-F I-Serum das homologe Antigen mit einem geringeren Titer als Rinderserum-Albumin.

Die Reagenten des Ringtestes nach Uhlenhuth wurden auch immun-elektrophoretisch überprüft. Positive Reaktionen im Ringtest ergaben bei der Immunelektrophorese Präzipitate im Agargel. Bei negativen Reaktionen nach Uhlenhuth zeigten die Reagenten auch keine Präzipitationslinien bei der Immunelektrophorese.

Immunelektrophoretische Bilder

Anti-F I- bzw. -PF I-Seren reagierten in der Immunelektrophorese tierartspezifisch, d.h. nur mit dem Antigen der homologen Tierart, nicht mit dem entsprechenden der anderen Tierart:

z.B.	Anti-Rind F I-Serum ./.	Rind F I	= +
	Anti-Rind F I-Serum ./.	Pferd PF I	= -

Die Präzipitationsbögen lagen im Bereich der Serumalbumine wie der Vergleich mit einem entsprechenden als Serum verwendeten Antigen und auch mit reinem Rinderserum-Albumin zeigte. Um die Identität dieser Komponente klarzustellen, wurde ein Anti-F I-Serum sukzessive mit Rinderserum-Albumin abgesättigt. Nach Absättigung mit 400 Mikrogramm / ml war der entsprechende Präzipitatbogen im Serumalbumin-Bereich verschwunden. Andere Präzipitatbögen blieben jedoch bei dieser Reaktion zwischen Serumalbumin-abgesättigtem Anti-F I-Serum und homologem Antigen erhalten. Diese Komponenten wiesen eine geringere Wanderungsgeschwindigkeit auf und zogen sich z.T. bis in den Globulin-Bereich hinein. Dabei handelte es sich um mindestens vier deutlich sichtbare Präzipitationsbanden. Die Uneinheitlichkeit der F I-Fraktion ist damit erwiesen. Gleichzeitig weist dieser Versuch aber auch nach, daß die F I-Fraktion eine Komponente enthält, die, zumindest was die Ladungsgröße und das immunologische Verhalten anbetrifft, von einem Serumalbumin der homologen Tierart nicht zu unterscheiden ist.

Auch die PF II-Fraktion wurde immunelektrophoretisch untersucht. Diese Fraktion enthielt niedermolekulare Komponenten und war stets gefärbt. In ihr befand sich also auch das Myoglobin. Versuchsweise vorgenommene Immunisierungen mit einer

F_{II}-Fraktion (also nur durch wässrige Extraktion gewonnen) waren fehlgeschlagen, offenbar, weil die verwendete Dosierung zu einer Antikörperbildung nicht ausgereicht hatte. Im Ringtest hatten sich die PF II-Antigene durch eine scheinbar völlig unspezifische Reaktion ausgezeichnet (vgl. Tabelle), was besonders darin zum Ausdruck kommt, daß die beiden Anti-Rind-PF II-Seren das heterologe vom Pford stammende Antigen mit einem höheren Titer fällten als das autologe Antigen.

Die immunoelektrophoretische Analyse brachte hier eine interessante Aufklärung. Sowohl bei homologer als auch bei heterologer Reaktion fanden sich nämlich ineinander übergehende unscharf getrennte Bögen, die sich von der Kathode bis zur Anode hinzogen. Sie waren im Globulinbereich etwas stärker ausgeprägt. Bei der Reaktion mit dem autologen Antigen hingegen zeigten die Reagenten im Globulinbereich einen weiteren kräftig ausgeprägten Bogen, der bei der heterologen Reaktion nicht vorhanden war. Die Stärke der Reaktion und die Lokalisierung dieser Präzipitatbande ließen nur den Schluß zu, daß es sich um eine Reaktion des Myoglobins mit einem spezifischen Antikörper handelte. Damit ist erneut die Species-Spezifität der Myoglobine unter Beweis gestellt, wie sie auch von Kosztvüs u. Várterész (1945) sowie Kendrew u. Mitarb. (1954) bereits beschrieben worden ist. Auffälligerweise zeigen all diese Komponenten weder mit Serumeiweißen noch auch mit der ersten Hauptfraktion der Sarkoplasma-Eiweiße irgendeine serologische Verwandtschaft. Damit ist die in einem anderen Zusammenhang vertretene These (2) widerlegt, die serologische Reaktionsfähigkeit von Muskelextrakten gehe nur auf die in ihnen enthaltenen Reste von Serumeiweiß zurück.

Schließlich wurden auch noch die nach Giles aufgetrennten Rind-Muskelextrakte mit einem homologen Anti-Serumalbumin-Serum zur Reaktion gebracht. Hierbei ergaben die Fraktionen 46 bis 57 eine stark positive Reaktion mit Titern von mehr als 1:50 000. Dieser Fraktionen-Bereich entspricht dem von

Giles als V 2 bezeichneten Abschnitt. Er enthält Proteine mit einem Molekulargewicht in der Größenordnung von 110 000. Die übrigen Fraktionen zeigten keine Reaktion mit diesem Antiserum, jedoch reagierten die Anti-PF II-Seron mit einem sehr hohen Titer gegenüber der von Giles als V 5 A und B bezeichneten Fraktion. Die letztere enthält das Myoglobin.

Diese Reaktionen zeigen wiederum, daß die von uns für Immunisierungszwecke verwendeten Antigene durchaus komplex zusammengesetzt sind. Andererseits zeigen sie aber auch, daß die Fraktionierung nach Giles ein sehr gutes Hilfsmittel ist, um wohldefinierte und scharf abgegrenzte Sarkoplasma-Fraktionen zu gewinnen. Weiteren Untersuchungen muß eine Immunisierung mit solchen schärfer aufgetrennten Einzelfraktionen vorbehalten bleiben.

Die vorliegenden Ergebnisse lassen die Schlußfolgerung zu, daß die Sarkoplasma-Proteine aus einer ganzen Reihe antigenanalytisch differenter Fraktionen bestehen. Nur einigen von ihnen kommt eine echte Tierart-Spezifität zu, während andere anscheinend nur eine Organ-Spezifität besitzen und somit die entsprechenden Muskelextrakte zur Identifizierung der Tierart untauglich machen.

Zusammenfassung:

Wässrige und phosphatpufferhaltige Skelettmuskulatur-Extrakte von Rind und Pferd wurden durch Gelfiltration über Sephadex G-75 bzw. G-100 fraktioniert. Die immunologischen Eigenschaften zweier Komponenten wurden mittels Präzipitation, Immunisierung von Kaninchen und Immunelektrophorese untersucht.

Die erste Hauptfraktion enthielt neben anderen eine albuminartige Proteinkomponente, die in ihren serologischen Eigenschaften dem Serumalbumin ähnelte. Anti-Seren gegen diese Fraktion waren tierartsspezifisch und ließen sich durch homologes Serumalbumin absättigen.

Die zweite Hauptfraktion enthielt mehrere Komponenten niedrigeren Molekulargewichtes, u.a. auch das Myoglobin. Auch mit dieser Fraktion ließen sich Kaninchen immunisieren. Die gewonnenen Antiseren wiesen Präzipitine auf, die nur gegen Muskeleiweiße, nicht aber gegen Serumproteine der homologen Tierart gerichtet waren. Eine tierartlich gebundene Spezifität der Myoglobine ließ sich nur durch die immunelektrophoretische Untersuchung nachweisen. Daneben zeigte diese zweite Fraktion aber Antigenkomponenten, die offenbar bei Pferd und Rind gemeinsame Determinanten aufweisen.

Literatur

=====

1. Barten, U. (1965): Immunologische Untersuchungen an einigen wasserlöslichen Muskeleiweißen. Vet.med.Diss. FU Berlin.
2. Bubloz, A. (1962): Contribution au dépistage de falsifications de préparations de viande par adjonction de viande de cheval. Application de la méthode de double diffusion dans le gel (Ouchterlony). Zbl.Vet.med. 9, 961-977.
3. Beisenherz, G., H.J. Boltze, Th. Bücher, R. Czok, K.H. Garbade, E. Meyer-Arendt u. G. Pfeleiderer (1953): Diphosphofructose-Aldolase, Phosphoglyceraldehyd-Dehydrogenase, Milchsäure-Dehydrogenase, Glycerophosphat-Dehydrogenase und Pyruvat-Kinase aus Kaninchenmuskulatur in einem Arbeitsgang. Zschr.Naturforsch. 8b, 555-577.
4. Durand, M., u. R. Schneider (1962): Relations antigéniques de diverses espèces de mammifères par l'étude de l'immuno-électrophorèse de leur sérum sanguin. Arch.Inst.Pasteur Tunis 39. 137-151
5. Dieselben (1962): Immuno-électrophorèse des jus de viande et son application dans la détection des fraudes. Arch.Inst.Pasteur Tunis 39, 153-163.
6. Giles, B.C. (1962): Species differences observed in the sarcoplasmic proteins of mammalian muscle. J.Sci.Food Agric. 13, 264-268.
7. Derselbe (1965): Studies on beef sarcoplasmic proteins. XIth European Meeting of Meat Research Workers.
8. Kendrew, J.C., R.G. Parrish, J.R. Marrack u. E.S. Orlans (1954): The species specificity of myoglobin. Nature 174, 946-949.
9. Kesztyüs, L., u. V. Várterész (1945): Die Antigeneigenschaften des Myoglobins. Zschr.Immunit.forsch. 105, 372-382.
10. Lowry, O.H., H.J. Rosebrough, A.L. Farr u. R.J. Randall (1951): Protein measurement with the Folin phenol reagent. J.Biol.Chem. 193, 265.

11. Manteufel, P., u.
Y. Tomioka (1924): Über die Benutzung von Fleisch an Stelle von Serum als Antigen bei der Herstellung von präzipitierenden Antisera für die biologische Lebensmitteluntersuchung.
Zbl.Bakt. I Orig. 91, 317.
12. Szent-Györgyi, A.G.,
u. H. Holtzer (1960): Fixation of muscle proteins with antibodies.
Biochim.Biophys.Acta 41, 14-19.
13. Thompson, R.R. (1960): Species identification by starch gel zone electrophoresis of protein extracts. I. Fish.
J.Assoc.Official Agric.Chem. 43, 763-764.
14. Derselbe (1961): Species identification by starch gel zone electrophoresis of protein extracts. II. Meat and eggs.
J.Assoc.Official Agric.Chem. 44, 787-788.
15. Derselbe (1962): Identification of fish species by starch gel zone electrophoresis of protein extracts.
J.Assoc.Official Agric.Chem. 45, 275-276.