

# Die Serodiagnostik in der botanischen Verwandtschaftsforschung.

Von

**E. Gilg und P. N. Schürhoff.**

Die Erforschung der Phylogenie des Pflanzenreiches bietet große Schwierigkeiten, die sich vor allem daraus ergeben, daß viele Zwischenglieder der jetzt lebenden Pflanzengruppen ausgestorben sind, und daß ferner die jetzt lebenden Pflanzen eine bestimmte Entwicklungshöhe einnehmen, die von derjenigen zur Zeit ihres Abzweigens von einer anderen Pflanzengruppe verschieden ist. Gerade durch die letztere Tatsache finden wir bei den einzelnen Pflanzengruppen eine große Menge progressiver und regressiver Merkmale, die größtenteils wirt durcheinander vermengt sind, so daß eine Pflanzenfamilie gegenüber der anderen nicht nur entweder durch progressive oder regressive Merkmale unterschieden werden kann.

Wenn nun schon in der Bewertung der einzelnen Merkmale eine ziemliche Übereinstimmung unter den Forschern erzielt ist, so gilt dies nicht von der Gesamtheit der Merkmale einer Pflanzengruppe an sich. Es wäre daher von ausschlaggebender Bedeutung, wenn wir eine Methode hätten, die in vollkommen objektiver Weise genetische Zusammenhänge nachzuweisen geeignet wäre.

Von Mez und seinen Schülern wird diese Objektivität für die serodiagnostische Methode in Anspruch genommen. Die überraschenden Ergebnisse, die in Königsberg mit dieser Methode erzielt wurden, gaben Anlaß dazu, den »Königsberger Stammbaum« des Pflanzenreiches auf Grund der Serodiagnostik aufzustellen.

Gegen diesen Stammbaum wurden von verschiedenen Seiten schwerwiegende Bedenken erhoben, auch ist eine Nachprüfung der Königsberger Ergebnisse trotz vielfacher Aufforderung von Mez bisher nicht erfolgt, vor allem wohl aus dem Grunde, weil die serologischen Methoden den Botanikern im allgemeinen nicht geläufig sind und auch die Verwertung von Tiermaterial stark außerhalb des Betriebes unserer botanischen Institute fällt. Endlich ist noch sehr wesentlich, daß eine solche Nachprüfung auf breiter Basis mit genauer, wechselseitiger Kontrolle stattfinden muß, wozu also eine größere Zahl wissenschaftlicher Mitarbeiter gehört, die für

eine solche biologisch-chemische Tätigkeit gewisse Vorbedingungen besitzen müssen.

Wir haben uns nun entschlossen, diese Nachprüfung vorzunehmen, da wir glauben, eine ausreichende Anzahl geeigneter Mitarbeiter gefunden zu haben, die alle ihr pharmazeutisches Staatsexamen abgelegt und dadurch ihre Qualifikation für biologisch-chemisches Arbeiten nachgewiesen haben.

Wir stützen uns daher bei unseren Angaben, die eine allgemeine Einleitung für die Einzelarbeiten sein sollen, auf die Untersuchungsergebnisse der ersten gemeinsamen Serie unserer Mitarbeiter, nämlich der Herren BÄRNER, HELWIG, HUHNS, NAY und ZARNACK.

Da es sich bei unseren Untersuchungen vor allem darum handelt, vergleichbare Ergebnisse zu erhalten, war zuerst zu entscheiden, welche Methodik anzuwenden war. Hierbei war es von wesentlicher Bedeutung, die serodiagnostischen Methoden einwandfrei zu erlernen und zu befolgen, was wir dadurch sichergestellt zu haben glauben, daß wir mit unseren Mitarbeitern die Behandlung des Tiermaterials (intravenöse und intraperitoneale Injektionen, Probekblutentnahme und Entblutung) uns mehrfach im Kaiser-Wilhelm-Institut für experimentelle Therapie, Berlin-Dahlem, vorführen ließen, bzw. dort ausführten; wir sprechen deshalb hier Herrn Prof. Dr. NEUBERG sowie Herrn Prof. Dr. REITTER, die sich unserer persönlich annahmen, unseren verbindlichsten Dank aus.

Die serodiagnostischen Methoden im besonderen wurden uns im Bakteriologischen Institut des Reichsgesundheitsamtes, Berlin-Dahlem, wiederholt vorgeführt; unsere Mitarbeiter lernten dort vor allem die forensischen Methoden des Nachweises bestimmter Blutarten kennen, ferner die Filtrationsmethoden sowie die zweckentsprechende Aufbewahrung von Normal- und Immunsereen. Unsere Mitarbeiter blieben in ständiger Fühlung mit dem genannten Institut und ließen ihre Ergebnisse zum Teil auch dort kontrollieren. Wir haben daher die angenehme Pflicht, dem Leiter des Institutes, Herrn Geheimrat Prof. Dr. HAENDEL, sowie Herrn Oberregierungsrat Prof. Dr. MANTEUFFEL unseren herzlichsten Dank für ihre ständige Hilfsbereitschaft auszusprechen.

Da endlich der eine von uns (SCH.) über spezielle serologische Erfahrungen in der Industrie verfügt, und selbstverständlich stets eine gegenseitige Kontrolle in weitgehendster Weise stattfand, glauben wir alles Erreichbare zur Sicherstellung unserer Ergebnisse getan zu haben.

Bei der ersten Serie von Untersuchungen haben wir uns zunächst auf die Präzipitin-Reaktion nach UHLENHUTH beschränkt und von den anderen von MEZ verwendeten Methoden vorläufig abgesehen, doch sind Arbeiten hierüber schon eingeleitet.

MEZ läßt nach verschiedenen Methoden arbeiten; er benutzt, wenn auch selten, das UHLENHUTHsche Verfahren, bei dem die Bildung von Präcipitinen beim Überschichten von Serum mit Antigen durch die Bildung des

Uhlenhuth-Ringes erkennbar ist. Ferner benutzt er eine von ihm ausgebildete Methode zur Erzeugung von Niederschlägen in Agglutinationsröhrchen, die mit einer Mischung von Antigen und Serum beschickt sind, und deren Niederschlag nach 12stündigem Aufenthalt im Brutschrank festgestellt wird. Außerdem verwendet er noch eine sogenannte »Conglutinationsmethode«, die darin besteht, daß Antigen, Immunserum und Rinderserum gemischt werden. Endlich wendet er eine Methode an, um unter Ausschaltung des lebenden Tierkörpers durch Einwirkung von Antigen auf Serum ein Immunserum zu erzeugen, mit welchem dann die zu prüfenden Eiweißlösungen zusammengebracht werden.

Da wir der Ansicht sind, daß das einzige in der Serologie übliche Verfahren, nämlich das UHLENHUTHSche, in erster Linie herangezogen werden muß, während die anderen Methoden außer im Botanischen Institut in Königsberg keine Anerkennung oder Anwendung gefunden haben, so geben wir nur die Einzelheiten dieses von uns angewendeten Verfahrens an. Die Anwendung anderer Verfahren halten wir nur dann für zulässig, wenn ihre Ergebnisse vollkommen mit denen des genannten Verfahrens übereinstimmen; dann sind sie aber, wenn sie sich nicht durch besondere Vorteile auszeichnen, überflüssig; andernfalls aber, wenn sie nicht übereinstimmende Ergebnisse liefern, können sie zu Trugschlüssen führen.

Wir wollen es vermeiden, aus unseren Ergebnissen weitgehende Folgerungen abzuleiten, sondern möchten in erster Linie das Tatsächliche dem Urteil der Fachgenossen unterbreiten.

Im besonderen möchten wir Willkürlichkeiten ausscheiden, indem wir z. B. nicht die Forderung aufstellen, daß die Reaktionen reziprok verlaufen müssen. Fallen die Reaktionen reziprok verschieden aus, so kann entweder in dem einen Fall ein Fehler vorgekommen sein (sei es bei dem positiven oder dem negativen Ausfall), der auszumerzen wäre, oder aber die Reichweite des zur reziproken Reaktion verwendeten Serums war wesentlich verschieden, oder endlich, die Methode würde ihre Unbrauchbarkeit für die Feststellung verwandtschaftlicher Beziehungen zeigen. Wir sind aber nicht berechtigt, Ergebnisse zu negieren.

Wir halten uns ferner von einer Anzweiflung objektiv festgestellter Tatsachen der botanischen Forschung fern, im Gegensatz z. B. zu KIRSTEIN, der die Existenz von bewimperten Spermatozoiden bei *Ginkgo*, die durch zahlreiche Forscher festgestellt wurde, bezweifelte, oder zu MEZ, der nur die Publikation von TREUB über den Embryosack der Casuarinaceen kannte und sich folgendermaßen ausläßt: »Da geht alles auf das 'Proton pseudos' der TREUBSchen Untersuchungen über die Embryosäcke von *Casuarina* zurück. Stimmen diese Angaben, so ist die Übereinstimmung mit *Ephedra* frappant; dann wird man tatsächlich versucht, wie dies WETTSTEIN tut, die *Amentales* an die Basis der Dikotylen zu stellen. Aber, wer hat die Chromosomen in den *Casuarina*-'Embryosäcken' gezählt? TREUB hat es

nicht getan, damals achtete man noch nicht darauf. Sind die Embryosäcke von *Casuarina* wirklich haploid? Sind es wirklich Embryosäcke? —

Es muß aber darauf hingewiesen werden, daß genaue zytologische Untersuchungen über den Embryosack von *Casuarina* von JUEL (1902, 1903) und FRYE (1903) vorliegen, in denen gerade die Angaben von TREUB (1891) vollkommen bestätigt werden. Es sind also wirklich haploid Embryosäcke.

Es ist endlich auch nicht angängig, die abweichenden Ergebnisse anderer Forscher als falsch hinzustellen, ohne durch genaue Nachprüfung die Fehler aufgedeckt zu haben. Wir können uns z. B. nicht auf den Standpunkt von GOHLKE (1913) stellen, der abweichende Ergebnisse der Serologen WENDELSTADT und FELLNER (1910) mit den Worten abtut: »Es muß bei diesen Untersuchungen unbedingt ein Fehler unterlaufen oder eine störende Nebenerscheinung aufgetreten sein.«

Wenn wir nun auf unser Thema selbst eingehen, so muß unsere Fragestellung lauten: Gelingt es durch die serodiagnostische Präzipitinreaktion genetische Beziehungen im Pflanzenreiche festzustellen?

Diese Frage zerfällt wieder in zwei Unterfragen:

a) Ist die Methode zuverlässig zum Identitätsnachweis, also als spezifisch zu gestalten?

b) Beziehen sich die unspezifischen Reaktionen nur auf verwandte Gattungen, oder treten unspezifische Reaktionen mit den verschiedensten Reihen des Pflanzenreiches auf?

Während die Präzipitinreaktion im Tierreich sich nur für Identitätsreaktionen allgemeine Anerkennung erworben hat, treten, worauf ROSEN (1925) aufmerksam macht, die Serumreaktionen nicht nur zwischen Arter enger Verwandtschaftskreise, sondern selbst noch bei Vertretern weit voneinanderstehender Pflanzenfamilien auf. Möglicherweise liege eine Erklärung des gegen die Tiere abweichenden Verhaltens darin, daß die Reaktionen der Pflanzen nicht ohne Mitwirkung tierischer Sera gewonnen werden können, also unter Teilnahme von Stoffen, die dem pflanzlichen Eiweiß ferner stehen als dem tierischen.

Es ist aber weiter noch zu beachten, daß die zur Immunisierung dienenden Antigene keineswegs dem spezifischen Protoplasten der Pflanzen entsprechen, sondern so gut wie ausschließlich Eiweißreservestoffe der Pflanze sind, worauf schon GOHLKE (1913) hinweist, daß also infolgedessen die Anschauung nicht richtig ist, daß wir bei diesen Untersuchungen im wesentlichen das Primäre, nämlich die geringste Änderung im Vererbungs-substrat, erfassen, sondern in der Hauptsache Reservestoffe, die den einzelnen Pflanzen mehr oder weniger eigentümlich sind. Ebenso wie wir die Verschiedenheit der Stärkekörner in vielen Fällen zur Unterscheidung benutzen können, so würden wir durch die Serumreaktionen die Ver-

chiedenheit des Reservestoffeiweißes verschiedener Pflanzen feststellen können.

Daß tatsächlich die Königsberger Schule sich vor allem auf das Reservestoffeiweiß stützt, ergibt sich aus den nachfolgenden Angaben von MALLIGSON (1922): »Dagegen haben meine Untersuchungen mehrfach an Stellen, wo GOHLKE negative Ergebnisse erhielt, positive Reaktionen erzielt. Dies ist besonders bezüglich der *Salicaceae* der Fall, die nach GOHLKE keinen Anschluß an die *Amentales* ergaben, während ich den sicheren Anschluß dieser Familie an die übrigen Kätzchenträger nachweisen konnte. Die genaue Nachprüfung dieses Falles ergab, daß die von GOHLKE verwendeten *Salix*-Samen alle taub waren, also überhaupt kein Eiweiß an die Lösungsmittel abgeben konnten.«

Würden wir zur Reaktion das Eiweiß der Vererbungsträger, also die möglicherweise primäre Veränderung zwischen zwei Pflanzenarten, benutzen, so müßten wir zuerst das Reservestoffeiweiß, welches doch die Reaktion völlig verschleiern würde, ganz ausschalten und müßten z. B. ausschließlich mit dem Eiweiß der Chromosomen arbeiten.

Erst wenn sich ferner gezeigt haben sollte, daß die unspezifischen Reaktionen sich nur auf verwandte Gattungen oder nahverwandte Familien erstrecken, daß aber unspezifische Reaktionen mit nach unserer bisherigen Auffassung ganz entfernt stehenden Familien nicht auftreten, können wir aus den Ergebnissen der Serodiagnose auf Verwandtschaftsverhältnisse schließen.

Endlich noch einige Worte über den »Königsberger Stammbaum des Pflanzenreiches«. Der erste vom Jahre 1924 zeigt auf der Hauptachse des Stammes zahlreiche Familien, z. B. *Pinaceae*, *Ranunculaceae*, *Berberidaceae*, *Lardixabalaceae*, *Resedaceae*, *Violaceae*, *Cucurbitaceae* und *Compositae*. Aus diesem Stammbaum muß man herauslesen, daß die Compositen in ihrer phylogenetischen Entwicklung einmal zu den genannten Familien gehört haben, und daß sich die genannten Familien unmittelbar voneinander ableiten. So sagt z. B. auch ALEXNAT von den *Cucurbitaceae* ausdrücklich: »Diese Familie, welche ebensogut der Parietales- wie der Symptalenreihe angehört, welche also den Knotenpunkt darstellt . . .« usw.

Ganz anders verhält sich der Stammbaum vom Jahre 1926. Dies ist insofern gar kein Stammbaum mehr, weil die Eltern usw. darauf vollkommen fehlen. Alle Familien und Gattungen, die vorher auf der Hauptachse verzeichnet waren, sind auf kleine Seitenachsen verlegt worden. Neue Untersuchungen, die eine solche Revision rechtfertigen könnten, liegen nicht vor. Die Änderung scheint also auf Grund von Deduktionen vorgenommen zu sein. Jedenfalls kommt MEZ aber mit dieser Auffassung den Ansichten der Systematiker wesentlich näher.

Wir gehen nunmehr über zu einer Beschreibung der von unseren Mitarbeitern angewandten Methodik. Da deren Arbeiten in kürzester Zeit

erscheinen werden, halten wir uns nicht für berechtigt, die Resultate bereits jetzt mitzuteilen oder eine Auswertung derselben vorzunehmen.

Die Arbeiten der genannten Mitarbeiter werden in diesen Jahrbüchern erscheinen oder eingehend besprochen werden.

### Herstellung der Antigene.

Zur Bereitung der Antigene, die sowohl zum Impfen der Versuchstiere als auch zu den Reaktionen gebraucht werden, verwenden wir Samenmaterial. Nur in seltenen Fällen, z. B. wenn Samen von der betreffenden Pflanze nicht beschafft werden konnten, dienten Blätter oder Wurzelmaterial zur Herstellung von Antigenen.

Die Samen werden vor dem Pulvern, soweit es möglich ist, von Fruchtteilen, Samenschalen usw. befreit. Dieses so vorbereitete Material wird in großen Porzellanmörsern zu einem groben Pulver zerstoßen.

Samenpulver, die fettes oder ätherisches Öl enthalten, werden mit Äther ausgezogen. Das Entfetten durch Äther geschieht mit Hilfe des Soxhlet-Apparates. Gestaltet sich bei manchen Samen das Ablösen der Samenschale sehr schwierig, so ist es empfehlenswert, die Samen mit Schale zu pulvern und bei ölhaltigen Samen zu entfetten. Nach dem Pulvern und der Ätherextraktion läßt sich dann das Samenpulver leicht von den Schalteilen durch Absieben trennen. Auf diese Weise erhielten wir z. B. aus Samen Lini ein von Samenschalen und damit auch von Schleim fast völlig befreites Pulver.

Die Samenauszüge werden gewöhnlich mit physiologischer Kochsalzlösung hergestellt. Im allgemeinen arbeiten wir nach den Angaben von MEZ, d. h. wir ziehen zur Herstellung unserer Impfflüssigkeiten 2 g Samenpulver mit 10 ccm physiologischer Kochsalzlösung aus, und zwar  $\frac{1}{2}$  Stunde bei Zimmertemperatur und unter öfterem, kräftigem Umschütteln. Bei manchen Samen ist es empfehlenswert, besonders bei eiweißarmem Material, dieses mit konzentrierterer Kochsalzlösung, z. B. 5% iger, auszu ziehen. Man kann auf diese Weise mehr Eiweiß als mit physiologischer Kochsalzlösung in Lösung bringen.

Der Eiweißgehalt der Samenauszüge wird durch die Essbach-Probe bestimmt. Die Menge des Eiweißniederschlages lesen wir in englumiger Maßzylindern nach 24 Stunden ab. Eine bessere und exaktere Bestimmung des Eiweißgehaltes läßt sich durch die sogen. Kochprobe erzielen. Bei den Impflösungen ist eine präzise Bestimmung des Eiweißgehaltes nicht nötig, wohl aber bei den zu Reaktionen benutzten Antigenen, deren Eiweißgehalt möglichst gleichmäßig einzustellen ist.

Bei stark schleimhaltigem Samenmaterial verwenden wir, um ein besseres Filtrieren zu ermöglichen, nicht Auszüge von der Stärke 2:10, sondern 1—1,5:10.

Zeigte nach wiederholter Filtration der Sameneiweißauszug noch eine Trübung, so wurde er im Seitz-Apparat durch ein K-Filter (Klärungsfilter) filtriert. In diesem Fall ist es jedoch nötig, den Eiweißgehalt des Filtrates erneut nachzuprüfen.

Große Schwierigkeiten bereitete uns im Anfang die Beseitigung des Schleims aus unseren Auszügen schleimhaltiger Samen. Wir versuchten den Schleim durch Zentrifugieren und nachfolgendes Abgießen von der Eiweißlösung zu scheiden, was jedoch nur unvollkommen gelang. Bedeutend besser erreicht man dies durch fraktionierte Filtration. Da der Schleim erst gegen Ende der Filtration das Filter passiert, so unterbrechen wir die Filtration vor diesem Zeitpunkt und trennen so den Eiweißauszug von dem mit in Lösung gegangenen Schleim.

Oft erzielen wir durch physiologische oder 5 % ige Kochsalzlösung bei Zimmertemperatur und halbstündigem Stehenlassen aus dem Samenmaterial keine Lösung des Eiweißes. Wir lassen dann die Samen bis 6 Stunden und eventuell bei gelinder Wärme ausziehen. Ist auch dies vergebens, so wird statt Kochsalzlösung 0,4—1 % ige Natronlauge verwendet. Die 0,4 % ige Natronlauge kann man, ohne vorher zu neutralisieren oder zu verdünnen, unbedenklich in die Venen oder ins Peritoneum der Versuchstiere injizieren.

Um eine gewisse Sterilität unserer Impflösungen zu erzielen, werden sämtliche zur Antigenbereitung benutzten Lösungen, sowie die dazu nötigen Gefäße sterilisiert; wir sind uns aber im Klaren, daß ein wirklich steriles Arbeiten unmöglich ist, da wir das Samenmaterial nicht sterilisieren können.

Aus diesem Grunde ist es auch mit wenigen Ausnahmen unmöglich, die Antigene länger als 24 Stunden aufzubewahren, da sich nach dieser Zeit die Antigene trüben und unbrauchbar werden.

Wir haben zwar versucht, durch Filtration mit dem Seitz-Apparat unter Verwendung von EK-Filtern (Entkeimungsfiltern) unsere Antigene zu sterilisieren und damit haltbar zu machen. Doch mußten wir von dieser Methode absehen, da das gelöste Eiweiß unserer Antigene entweder ganz oder zum größten Teil von der Filterplatte zurückgehalten wurde. Es ist also unbedingt notwendig, die Antigene stets frisch zu bereiten.

### Immunisierung.

Mit den so gewonnenen Antigenen impfen wir die Kaninchen. Wir weichen insofern von der Mezschen Methode ab, als wir die Anzahl der Impfungen bedeutend herabsetzen und die der intraperitonealen und intravenösen Injektionen in ein anderes Verhältnis bringen. Dies geschieht deshalb, weil wir durch wiederholte Probelutentnahme feststellten, daß der Titer nach zuviel (über 40) Impfungen nicht mehr zunahm, sondern in manchen Fällen sogar herunterging. Wir vermeiden auf diese Weise auch

einen zu großen Tierverlust. Die Anzahl von 40 Impfungen ist nur in vereinzeltten Fällen überschritten, um eventuell höhere Titer zu erreichen. Die Art der Immunisierung ist folgende:

Wir beginnen mit 3 intravenösen Spritzen zu 3, 2, 4 ccm, die von 3 intraperitonealen zu 6, 7, 8 ccm abgelöst werden. Die Einspritzung selbst erfolgt nach der allgemein angewandten Methode. Der Abstand der einzelnen Impfungen beträgt immer 2—4 Tage. Bei dieser Art der Immunisierung stellten wir fest, daß das Wohlbefinden der Tiere in keiner Weise beeinträchtigt wurde und ein genügender Immunisierungsgrad sich so am besten erreichen ließ.

Nach der 6. Einspritzung folgt eine Ruhepause von 1 Woche, worauf wir die Probelutentnahme vornehmen, nachdem wir das Tier 4 Tag haben hungern lassen. Nur wenn dann ein Titer von 3200 noch nicht erreicht ist, injizieren wir nochmals 2—4 intraperitoneale Spritzen von 6—10 ccm. Ist jedoch nach 6 Einspritzungen ein Titer von mindestens 3200 erreicht, so schreiten wir nach 10 Tagen, gerechnet von der letzten Injektion, zur Entblutung des Tieres, nachdem das Tier zuvor 4 Tag gehungert hat.

### Gewinnung des Immunserums.

Hat die Titerstellung nach der Probelutentnahme einen genügend hohen Wert des Serums ergeben, so wird zur Entblutung des betreffenden Kaninchens geschritten. Während wir zuerst die von Mez angegebene Methode befolgten, die eine schnelle Verarbeitung des Serums an den Tagen nach der Entblutung des Tieres erforderlich macht, so sind späterhin sämtliche Immunsera nach der in der Bakteriologischen Abteilung des Reichsgesundheitsamtes angewandten Arbeitsweise gewonnen worden.

Aus dem Folgenden ist ersichtlich, welche Vorteile gegenüber der von Mez angegebenen Methode erzielt werden:

Die Tiere werden nicht, wie Mez es empfiehlt, vor dem Freilegen und Öffnen der Halsschlagader narkotisiert, sondern einfacher durch einen kräftigen Schlag ins Genick betäubt. Dann wird mit einem schmalen, scharfen Messer die Halsschlagader zwischen Halswirbel und Luftröhre derart durchschnitten, daß letztere nicht verletzt wird. Die Schneide des Messers ist der Halswirbelseite zugekehrt, und das Tier wird in eine große sterile Drigalski-Schale entblutet. Hat sich nach etwa 12 Stunden der Blutkuchen abgesetzt, so wird das Immunserum für sich in Zentrifugengläschen gesammelt und der Blutkuchen mit einem sterilen Spatel aufgeteilt, um ebenfalls in sterilen Zentrifugengläschen abzentrifugiert zu werden. Durch die wiederholte Aufteilung des Blutkuchens zum Zwecke des Abzentrifugierens wird eine sehr vorteilhafte Ausbeute an Immunserum erzielt, was bei den an und für sich kleinen Mengen, die ein Kaninchen an Serum liefert, von großer Bedeutung ist.

Zur Konservierung des Serums bedienen wir uns nicht chemischer Mittel, wie sie von MEZ und anderen Autoren zur Haltbarmachung vorge schlagen werden, sondern filtrieren im Filtrierapparat von UHLENHUTH und WEIDANZ, der auch von GOHLKE erwähnt wird. Zur Filtration werden Filterscheiben verwendet von etwa 2—3 mm Stärke, die nach Angabe von Prof. MANTEUFFEL in einem auseinander-schraubbaren, aus versilbertem Kupfer bestehenden, nutschenähnlichen Trichter eingeklemmt und nach jedesmaligem Gebrauch entfernt werden. Zur Verwendung kommen zwei Arten von Filterscheiben, eine K-Schicht (Klärungsschicht), durch die das Serum zuerst filtriert wird, und eine EK-Schicht (Entkeimungsschicht) für eine zweite Filtration zum Zwecke der Entkeimung. Aufsatztrichter und Filterscheiben werden von der Firma Seitz-Kreuznach geliefert. Das Immunserum wird in der Glasflasche des sterilisierten Filtrierapparates aufgefangen, um dann in sterilen Ampullen aus braunem Fiolax-Glas unter den nötigen Kautelen abgefaßt und eingeschmolzen zu werden. Die Ampullen sind etwa 10 cm lang bei 1 cm im Durchmesser und haben unten eine kurze Spitze. Diese hat den Zweck, etwa sich bildendes Sediment aufzunehmen und so eine klare Entnahme des Immunserums bei Verwendung zu ermöglichen. Nach den in der Bakteriologischen Abteilung des Reichsgesundheitsamtes gemachten Erfahrungen hält sich das auf diese Weise behandelte Serum jahrelang brauchbar, wenn es bei niedriger Temperatur vor Licht geschützt aufbewahrt wird. Auch wir haben die Beobachtung gemacht, daß ein derartig konserviertes Serum nach Monaten an Wert nicht eingebüßt hat. Es darf nicht unerwähnt bleiben, daß in der Regel eine nach der Filtration angestellte Titerstellung gegenüber der nach der Probelutentnahme gemachten Titerstellung einen etwas niedrigeren Wert ergibt. Der Grund hierfür dürfte darin zu suchen sein, daß immerhin eine geringe Adsorption durch die Filterschicht stattfindet. Da der Titerrückgang innerhalb minimaler Grenzen liegt, können derart konservierte Sera unbedenklich zu Versuchen verwendet werden. Gegenüber der durch chemische Mittel erreichten Konservierung berücksichtigt die oben beschriebene Methode die Labilität des Eiweißmoleküles. Die doppelte Filtration führt zur vollkommenen Sterilität, in der das Eiweiß keinen weiteren Veränderungen ausgesetzt ist.

### Bereitung der Antigene für die Serumreaktionen.

Da es für diese zur Ausführung der Präcipitinreaktion bestimmten Antigene im Gegensatz zu den Impfantigenen darauf ankommt, möglichst klare Flüssigkeiten zu erlangen, so müssen die Antigene oft besonders filtriert werden. Es hat sich nämlich gezeigt, daß trotz sorgfältiger Vorbehandlung des eiweißhaltigen Materials und trotz Anwendung von gehärteten Filtern von »Schleicher & Schüll« kolloidal gelöste Stoffe die Auszüge oft

trüben. Wir wenden deshalb in solchen Fällen die bereits erwähnten Klärungsfilter von Seitz an. Genügt einmaliges Filtrieren nicht, so muß es bis zur spiegelblanken Klärung wiederholt werden. Als Eiweißlösungsmittel benutzen wir physiologische Kochsalzlösung und 0,4—4 %ige Natronlauge. Letztere wird mit Essigsäure später neutralisiert. Die Neutralisation wird mit Hilfe von Phenolphthalein als Indikator vorgenommen und mit Lackmuspapier nachgeprüft. Es fragt sich nun, in welchem Mengenverhältnis Material und Lösungsmittel zueinander stehen sollen. Wir haben meist 0,4 g Pflanzenpulver mit 20 ccm Lösungsmittel ausgezogen und so die Verdünnung 1 : 200 erhalten. Hierdurch erzielt man Antigene mit sehr verschiedenem Eiweißgehalt, je nachdem man ein sehr eiweißreiches oder -armes Material verwendet, und je nachdem es von anhaftenden Schalen usw. gereinigt ist. Da aber die Antigene möglichst gleichen Eiweißgehalt haben müssen, einmal, um Vergleichswerte zu erzielen, und zweitens, weil bei eiweißreichen Antigenen die Normal-Sera weit mitreagieren, muß eine EiweißEinstellung stattfinden. Diese geschieht nach MEZ an Hand einer Eiweiß-Tabelle auf Grund von Essbach-Fällungen. Da jedoch ESSBACHS Reagenz stark abhängig von der Temperatur ist und außerdem Alkaloide und andere Stoffe mit gefällt werden, bedienen wir uns meist einer Methode, wie sie in der Bakteriologischen Abteilung des Reichsgesundheitsamtes üblich ist. Wir kochen eine Probe der Verdünnung 1 : 200 im Agglutinationsröhrchen kurz auf und setzen 2 Tropfen Salpetersäure hinzu. Die allmählich auftretende Trübung vergleichen wir mit einer Skala von Normaltrübungen, welche auf folgende Weise erhalten werden:

Eine Verdünnung eines Normal-Kaninchenserums 1 : 400, 1 : 200, 1 : 500, 1 : 1000 usw. wird aufgeköcht und ebenfalls mit Salpetersäure versetzt; die auftretenden Trübungen werden dann als Normen gebraucht. In Ampullen eingeschmolzen halten sich diese einige Tage.

Entspricht nun z. B. der Eiweißgehalt unseres Antigens 1 : 200 dem Eiweißgehalt der Normalverdünnung 1 : 1000, so wird die Antigeneiweißlösung als 1 : 1000 angesehen, entspricht er aber der Verdünnung 1 : 400, so muß das Antigen mit der gleichen Menge Kochsalzlösung verdünnt werden, um die Normalverdünnung 1 : 200 zu ergeben.

Durch die Essbach-Probe und die SalpetersäureEinstellung läßt sich einigermaßen genau der Eiweißgehalt einstellen. Wie wichtig eine solche Einstellung ist, zeigt auch die Leipziger Arbeit von ARZT, der einige Gramineen serodiagnostisch untersuchte und zu dem Ergebnis kam, daß eine Differenzierung derselben nur nach eingehenden Studien über den Eiweißgehalt überhaupt möglich ist.

Haben wir auf diese Art klare, eingestellte Antigene erhalten, so werden die weiteren Verdünnungen mit physiologischer Kochsalzlösung genau wie bei MEZ hergestellt, nämlich 1 : 200, 400, 800, 1000 usw. Vorgenommen werden diese Verdünnungen in Reagenzgläsern, aus denen die

Antigene mit Kapillarpipetten in die eigentlichen Reaktionsgläser übertragen werden.

Die Antigene ließen wir nicht längere Zeit stehen, sondern verwandten sie sofort zu den Reaktionen. Als Kontrollen für die serodiagnostischen Reaktionen benutzten wir erstens Antigene in der Verdünnung 1 : 200 ohne jeden Zusatz, zweitens Normalserum mit Antigenen in verschiedenen Verdünnungen und schließlich 1 ccm physiologische Kochsalzlösung mit 0,1 ccm Immunsorum.

### Die Präcipitation.

Bei der Anstellung der Reaktionen wird, wie oben schon ausgeführt wurde, nach der Präcipitationsmethode gearbeitet. Als sicherste und zuverlässigste Arbeitsweise hat sich das UHLENHUTHSCHE Verfahren bewährt. Anfangs wurde die MEZSCHE Methode angewandt, von der wir jedoch gänzlich abgekommen sind, so daß wir jetzt ausschließlich das eben erwähnte Verfahren benutzen. MEZ arbeitet, kurz skizziert, folgendermaßen: Es werden in einem Reagenzglas-Ständer 7 Gläschen mit den einzelnen Verdünnungen des betreffenden Antigens beschickt und 3 weitere mit den Kontrollen. Als dann wird das Serum zu den Antigenen hinzugegeben und zunächst  $\frac{1}{2}$  Stunde gewartet, ob etwa ein Uhlenhuth-Ring auftritt. Nach dieser Zeit werden die Flüssigkeiten innig gemischt und in einen Brutschrank mit konstanter Temperatur von  $37^{\circ}$  gebracht. Der endgültige Ablauf der Reaktion wird nach zwölf Stunden festgestellt. Die Beurteilung des positiven bzw. negativen Ausfalls der Reaktion gründet sich auf das Vorhandensein oder Nichtvorhandensein eines Niederschlages, der beim Aufrühren an der Schlierenbildung zu erkennen ist, falls er sich nicht von vornherein als Bodensatz von der Flüssigkeit deutlich abhebt. Der ganze Versuch wird nur dann gewertet, wenn die Kontrollproben vollkommen klar geblieben sind. Bei unseren Arbeiten hat sich nun herausgestellt, daß gerade diese wichtigste und unerläßliche Vorbedingung meistens fehlte. Bereits nach einem Zeitraum von 6 Stunden machte sich in vielen Fällen eine Trübung bemerkbar, die dann weiterhin immer deutlicher in die Erscheinung trat. Durch unsere kurzfristige Methode wird dieser Nachteil vermieden. Ein weiterer Nachteil der MEZSCHE Methode liegt in der großen Unzuverlässigkeit, als deren hauptsächlichste Ursache die Tatsache anzusprechen ist, daß die Wertung der einzelnen Versuche allzu sehr dem subjektiven Empfinden des Beobachters anheim gegeben ist. Während man nach der MEZSCHE Methode in vielen Fällen sehr oft im Zweifel darüber ist, ob diese oder jene Reaktion noch als positiv zu werten ist, bleibt bei der weiter unten zu beschreibenden Arbeitsweise jeder Irrtum ausgeschlossen. Es ist hier von vornherein die Objektivität des Beobachters gewährleistet. Ein anderer Vorteil unserer Methode liegt endlich in der Ersparnis an Serum. Wenn man nach den Angaben von MEZ arbeitet, so ist man gezwungen, stets größere Mengen

des betr. Serums in Anwendung zu bringen, als es nach unserem Verfahren notwendig ist.

Die praktische Ausführung unseres Verfahrens geschieht nach den langjährigen Erfahrungen der Bakteriologischen Abteilung des Reichsgesundheitsamtes. Danach werden an einem Ende zugeschmolzene Glasröhren von etwa 2—3 mm innerer Weite und 6 cm Höhe verwandt, in die zuers das Serum in einer Menge von etwa 3—5 mm Höhe vermittels einer kapillar ausgezogenen Pipette befördert wird. Alsdann wird das in den sog. Kapillaren befindliche Serum mit den einzelnen Verdünnungen des betr. Antigens mittels einer Kapillarpipette vorsichtig überschichtet, so daß die Berührungsgrenze der beiden Flüssigkeiten deutlich sichtbar bleibt.

Dies ist leicht zu erreichen, weil das Serum die spezifisch schwerere Flüssigkeit ist. Eine selbstverständliche Voraussetzung für den Versuch ist die Klarheit des Serums und des Antigens. Bei positivem Ausfall der Reaktion entsteht an der Berührungsfläche der beiden Flüssigkeiten eine deutlich erkennbare, weiße Zone, die als Uhlenhuth-Ring bezeichnet wird. Für gewöhnlich tritt bei den niederen Verdünnungen die Ringbildung sofort auf; bei den höheren erfolgt sie innerhalb der ersten 40 Minuten. Alle Ablesungen, die über die Zeit von 30 Minuten hinausgehen, werden von uns nicht verwertet, denn nach dieser Zeit erfolgt eine allmähliche Mischung der beiden Flüssigkeiten, und infolgedessen nimmt die Schärfe der Reaktion ab. Immerhin wurden die Beobachtungen auf 4 Stunde ausgedehnt.

Zum Schluß ist es uns eine angenehme Pflicht, der Notgemeinschaft der Deutschen Wissenschaft zu danken für die weitherzige Unterstützung durch Zuweisung von Mitteln, die es uns ermöglichten, die Untersuchungen an einem reichlichen Tiermaterial durchzuführen.

---

# ZOBODAT - [www.zobodat.at](http://www.zobodat.at)

Zoologisch-Botanische Datenbank/Zoological-Botanical Database

Digitale Literatur/Digital Literature

Zeitschrift/Journal: [Botanische Jahrbücher für Systematik, Pflanzengeschichte und Pflanzengeographie](#)

Jahr/Year: 1925

Band/Volume: [60](#)

Autor(en)/Author(s): Gilg Ernst Friedrich, Schürhoff Paul Norbert

Artikel/Article: [Die Serodiagnostik in der botanischen Verwandtschaftsforschung, 439-450](#)