

Einfluss der Unterkühlung auf die Desintegration der Tuberkelbakterien in Druckkammern

Für die Isolierung einzelner biologisch aktiver Bestandteile der Zelle ist möglicherweise eine optimale Desintegration der Zellstrukturen von höchster Bedeutung. Die morphologische Struktur von Tuberkelbakterien (Anwesenheit von relativ rigiden Zellwänden), sowie der hohe Anteil von lipoiden Stoffen sind die grössten Hindernisse, für die Anwendung der üblichen Desintegrationsmethoden^{1,2}. Nur die Desintegration in Druckkammern^{3,4} unter hohen Drucken, führt zur wirksamen Isolierung von makromolekularen Bestandteilen.

Die Unterkühlung der desintegrierten Bakterienmasse ist bei dieser, wie bei allen Methoden von hoher Geschwindigkeit für die Erhaltung der thermosensitiven isolierten Zellsysteme massgebend. Andererseits spielen auch die Druckverhältnisse in der Druckkammer während der Desintegration bei Struktur- und Funktionsänderungen

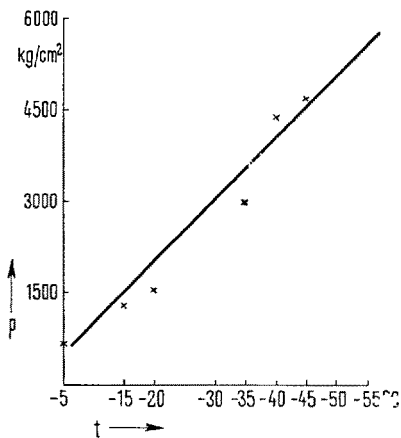


Fig. 1. Abhängigkeit der maximalen Druckwerte in der Druckkammer (p) von der gewählten Unterkühlung (t) während der Desintegration der Tuberkelbakterien.

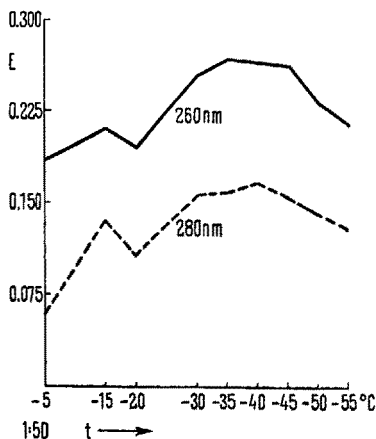


Fig. 2. Anwesenheit von Nucleinsäuren (260 nm) und Proteinen (280 nm) in zell- und zellwandfreier Tuberkelbakterienmasse, die in Unterkühlung desintegriert wurde. Einfluss der Unterkühlung auf die Ausbeute der Desintegration. Die einzelnen Punkte der Kurven stellen die Absorptionsextinktionen (im UV-Licht) im Supernatant nach einer fraktionierten Zentrifugation der desintegrierten Tuberkelbakterienmasse dar.

der isolierten Makromoleküle eine wichtige Rolle, wie bei *Bac. subtilis* festgestellt wurde⁵.

Wir studierten nun die Zusammenhänge zwischen der Temperatur und den Druckwerten und den Einfluss dieser beiden Faktoren auf die Wirksamkeit der Desintegration von Tuberkelbakterien (saprophytischer Stamm ATCC 607) ausführlich in Druckkammern nach der Modifikation von HUGHES⁶ unter streng vergleichbaren Versuchsbedingungen.

Wie aus Figur 1 ersichtlich ist, ermittelten wir dabei eine direkte beinahe lineare Beziehung zwischen der gewählten Unterkühlung (in $-^{\circ}\text{C}$) und den notwendigen maximalen Druckwerten in der Druckkammer unter dem Kolben (in kg/cm^2). Je grösser die Unterkühlung der Bakterienmasse, desto höhere Druckwerte erwiesen sich für die vollkommene Desintegration als notwendig.

Die Wirksamkeit der Desintegration ist aus Figur 2 zu ersehen. Die optimalen Werte für die Wirkung der Desintegration bewegen sich im Bereich von -30 bis -45°C . Bei grösserer Unterkühlung der Tuberkelbakterienmasse (bei höheren Druckwerten) sinkt die isolierte Nucleinsäure- und Proteinmenge allmählich ab. Bei nachträglicher Korrelation der Werte auf das Trockengewicht der desintegrierten Masse ($\mu\text{g}/\text{mg}$) bleibt der Charakter der Kurve unberührt.

Elektronenmikroskopisch wurden im optimalen Bereich der Werte Massen von zerbrochenen Tuberkelbakterien beobachtet.

Für die Anwendung der Desintegrationsmethoden in Druckkammern beliebiger Konstruktion folgen aus den oben erwähnten Resultaten einige praktische Hinweise. Die direkte Abhängigkeit zwischen der Unterkühlung und den nötigen Druckwerten (die höchstwahrscheinlich mit der Härte der Eiskristallstrukturen zusammenhängt) schliesst die Anwendung einer zu grossen Unterkühlung zur Isolation der makromolekularen Strukturen aus, da sich die damit erforderlichen hohen Druckwerte schon rein quantitativ als weniger günstig erweisen. Von noch grösserer Bedeutung wird unzweifelhaft auch die qualitative Wirkung zu grosser Druckwerte auf die sensitiven Strukturen der desintegrierten Tuberkelbakterienmasse sein. Hier ist vor allem für die erfolgreiche Desintegration die Berücksichtigung der optimalen Temperatur (Druck-Bedingungen) notwendig.

Summary. An inverse, almost linear, relationship was found between the temperature of frozen mycobacterial paste and the hydrostatic pressure necessary for disintegration of mycobacterial cells in pressure chambers. The optimal reproducible values of temperature pressure for the quantitative isolation of mycobacterial nucleoproteins were estimated in the range of -30 to -40°C per 3000 – 5000 kg/cm^2 .

ST. STAFLOVÁ, L. TRNKA
und J. NEJEDLÝ

Tuberkulose-Forschungsinstitut, Prag
(Tschechoslowakei), 13. Mai 1965.

¹ H. DE WIJS und P. JOLLES, *Biochem. biophys. Acta* **83**, 326 (1964).

² A. DECKEN und P. N. CAMPBELL, *Biochem. J.* **91**, 195 (1964).

³ A. S. YOUMANS und G. P. YOUMANS, *J. Bacteriol.* **87**, 278 (1964).

⁴ E. RIBI, T. PERRINE, R. LIST et al., *Proc. Soc. exp. Biol. Med.* **100**, 647 (1959).

⁵ C. G. HEDÉN, *Bacteriol. Rev.* **28**, 14 (1964).

⁶ D. E. HUGHES, *Brit. J. exp. Pathol.* **32**, 97 (1951).