

Partielle Reinigung von Panton-Valentine-Leukozodin von *Staphylococcus aureus* *

Partial Purification of Panton-Valentine-Leucozidin of *Staphylococcus aureus*

M. KANOE, H. BLOBEL, W. SCHAEK und K. WENK

Institut für Bakteriologie und Immunologie der Veterinärmedizinischen Fakultät der Justus Liebig-Universität Gießen

(Z. Naturforsch. 26 b, 621 [1971]; eingegangen am 9. Februar 1971)

Kürzlich beschrieben wir eine selektive Anreicherung des Panton-Valentine-Leukozidins (PVL) ¹, das möglicherweise einer der Virulenzfaktoren von *Staphylococcus aureus* ist ². Dieses Verfahren ist in der Zwischenzeit verbessert worden, dadurch, daß PVL nun frei von α -Hämolyysin und Nuclease dargestellt werden kann.

Zur Produktion von PVL wurde *S. aureus*, Stamm V 8, in LO₃-Medium ² ohne Natriumlaktat 10–12 Stdn. bei 37 °C unter ständigem Rühren bebrütet. Die Staphylokokken entfernten wir durch Zentrifugieren bei 10000 g für 15 Min. Jeweils 500 ml Kulturüberstand wurden wiederholt mit Aluminiumoxid-Cholesterin (ALO-Chol) bei 4 °C behandelt ¹, um α -Hämolyysin, Koagulase, Eigelbfaktor und Fibrinolyysin weitgehendst zu adsorbieren. Das noch im Überstand befindliche PVL konzentrierten wir durch Dialyse gegen gesättigte Ammoniumsulfatlösung und lösten das Präzipitat in 10 ml PBS ³ auf ¹. Diese Lösung wurde bei 4 °C 1 Stde. gegen PBS dialysiert und anschließend bei 12000 g 15 Min. klarzentrifugiert. Die PVL-Lösung gaben wir auf DEAE-Sephadex ** (45 cm · 2,5 cm) bei pH 7,0. Die Fraktionen mit PVL-Aktivität (gewöhnlich 5–7 mit jeweils 20 ml) wurden gesammelt und wieder durch Dialyse gegen gesättigte Ammoniumsulfatlösung konzentriert. Das präzipitierte PVL lösten wir in 18 ml PBS mit 5-proz. Ammoniumsulfat bei pH 7,0. Nachdem diese Lösung bei 12000 g 10 Min. klarzentrifugiert worden war, wurden 2 g vorher in PBS-Ammoniumsulfatlösung gewaschenes Aluminiumoxid (ALO) zugegeben und auf einem Magnetrührer 1 Stde. bei 4 °C gerührt. Das ALO wurde abzentrifugiert bei 12000 g für 10 Min. Den Adsorptionsprozeß wiederholten wir mit jeweils 1 und 0,5 g ALO.

Danach wurde die PVL-Lösung wie oben konzentriert und schließlich bei 4 °C gegen PBS dialysiert.

Sonderdruckanforderungen an Prof. Dr. H. BLOBEL, Institut für Bakteriologie und Immunologie der Veterinärmedizinischen Fakultät, D-6300 Gießen, Frankfurter Str. 87.

* Diese Untersuchungen wurden mit Unterstützung der Deutschen Forschungsgemeinschaft durchgeführt.

** Pharmacia, Uppsala, Schweden.

¹ M. KANOE, H. BLOBEL u. W. SCHAEK, Z. Naturforsch. 24 1431 [1970].

Zur Aufbewahrung von PVL eignete sich am besten gesättigte Ammoniumsulfatlösung bei 4 °C. Die minimale leukozide Dosis (MLeD) des PVL, die minimale hämolytische Dosis (MHD) des α -Hämolymins, sowie Koagulase, Eigelbfaktor, Fibrinolyysin, Nuclease und Protein wurden mit bereits beschriebenen Methoden bestimmt ^{1,4}. Das gegen PVL gewonnene Antiserum wurde zur immunoelektrophoretischen Analyse verwandt ¹.

Der Kulturüberstand enthielt neben PVL noch α -Hämolyysin, Koagulase, Eigelbfaktor, Fibrinolyysin und Nuclease, wie das bereits in der vorherigen Arbeit beschrieben worden ist ¹. Die Adsorption mit ALO-Chol verringerte im beträchtlichen Maße die α -hämolytische Aktivität und entfernte Koagulase, Eigelbfaktor und Fibrinolyysin ¹. Das α -Hämolyysin wurde durch die Chromatographie an DEAE-Sephadex weiter reduziert und schließlich durch die Adsorptionsschritte mit ALO eliminiert (Tab. 1). Das chromatographisch gereinigte

Methoden	MLeD*	MHD**
Kulturüberstand (500 ml)	522	65
1) + 15 g ALO-Chol***, 15 Stdn.		
2) + 10 g ALO-Chol, 8 Stdn.		
3) + 5 g ALO-Chol, 15 Stdn.	457	—
4) (NH ₄) ₂ SO ₄ konzentriertes PVL in 10 ml PBS	817	6
5) DEAE-Sephadex	351	3
6) Adsorption mit ALO****	5699	—

Tab. 1. Teilweise Reinigung des Panton-Valentine-Leukozidins (PVL). * Minimale leukozide Dosis PVL/mg Protein. ** Minimale hämolytische Dosis α -Hämolyysin/mg Protein. *** Aluminiumoxid-Cholesterin. **** Aluminiumoxid.

PVL hatte 5699 MLeD pro mg Protein. Ungefähr 128–256 MLeD entsprachen einer „Test-Dosis“ (L+) PVL ⁴. Die spezifische PVL-Aktivität konnte etwa 11-fach gesteigert werden. Das gereinigte PVL war nicht nur frei von Koagulase, Eigelbfaktor und Fibrinolyysin, sondern auch von α -Hämolyysin und Nuclease. Seine immunoelektrophoretische Analyse ergab 2 distinkte Linien, vermutlich die F- und S-Komponenten ⁵, die mit etwas verminderter Schärfe bereits dargestellt worden waren ¹.

² K. WENK u. H. BLOBEL, Zbl. Bakteriol., Parasitenkunde Infektionskrankh., Abt. I Orig. 213, 479 [1970].

³ R. C. PARKER, Methods of Tissue Culture, 3. Aufl., Hoeber & Row, New York 1964.

⁴ G. P. GLADSTONE, S. MUDD, H. D. HOCHSTEIN u. N. A. LENHART, Brit. J. exp. Pathol. 53, 295 [1962].

⁵ M. WOODIN, Biochem. J. 75, 158 [1960].