

Copyright ©

Es gilt deutsches Urheberrecht.

Die Schrift darf zum eigenen Gebrauch kostenfrei heruntergeladen, konsumiert, gespeichert oder ausgedruckt, aber nicht im Internet bereitgestellt oder an Außenstehende weitergegeben werden ohne die schriftliche Einwilligung des Urheberrechtinhabers. Es ist nicht gestattet, Kopien oder gedruckte Fassungen der freien Onlineversion zu veräußern.

German copyright law applies.

The work or content may be downloaded, consumed, stored or printed for your own use but it may not be distributed via the internet or passed on to external parties without the formal permission of the copyright holders. It is prohibited to take money for copies or printed versions of the free online version.

Über die Bestimmung von Eiweiß im Plankton mittels der Biuretreaktion¹⁾

Von J. KREY, K. BANSE und E. HAGMEIER

Eine in den Jahren 1951 und 1952 veröffentlichte Methode zur Bestimmung von Eiweiß in kleinen Planktonmengen (KREY 1951 und 1952) bis herunter zu 0,1 mg Trockengewicht hat in den folgenden Jahren eine vielfältige Bewährung und eine wesentliche Verfeinerung durch die Einführung eines lichtelektrischen Photometers — des Elko II von Zeiß — erfahren. Hier soll über diese Entwicklung berichtet und zugleich allen Interessenten eine zusammengefaßte Arbeitsvorschrift zur Verfügung gestellt werden.

Der Arbeitsgang ist derselbe geblieben und soll hier kurz dargelegt werden: Das Plankton wird zunächst auf einem dichten Papierfilter angesammelt, getrocknet und dann in NaOH hydrolysiert. Die Eigenfärbung des filtrierten Hydrolysates wird in einem Photometer bei dem Filter S 53 bestimmt, das Cu-Reagenz zugesetzt und nach vollständiger Ausfärbung der Biuretreaktion diese in ihrem Extinktionsmaximum bei S 53 bestimmt. Die Extinktion, die sich aus der Differenz beider Ablesungen ergibt, ist der gelösten Eiweißmenge linear proportional. Die Methode wird durch gleichartige Behandlung eines Vergleichspräparates („Albumin aus Eiern“ von MERCK) geeicht.

Um möglichst eine Störung durch Trübungen zu vermeiden, wird zugleich mit den vorgenannten Messungen die Extinktion aller nicht selektiv extingierenden Trübungen mit dem Filter S 75 bestimmt. Dieser Wert wird von der zugehörigen Eigenfärbung (Ef) bzw. Reaktionsfärbung (Rf) abgezogen; danach berechnet sich:

$$\begin{aligned}\text{Bruttoextinktion} &= (\text{Rf} - \text{Ef})_{\text{S } 53} - (\text{Rf} - \text{Ef})_{\text{S } 75} \\ \text{Nettoextinktion} &= \text{Bruttoextinktion} - \text{Blindwert}\end{aligned}$$

Die Methode wurde mit dem Pulfrich-Stufenphotometer von Zeiß entwickelt. Die Einführung des lichtelektrischen Photometers Elko II von Zeiß sowie der Umstand, daß uns ein solches Gerät von der Deutschen Forschungsgemeinschaft zur Verfügung gestellt wurde, erlaubten eine weitere Prüfung und Verfeinerung der Methode. Bisher wurden über 2500 Planktonproben nach dieser Methode analysiert, sodaß jetzt weitere Erfahrungen vorliegen, die hier mitgeteilt werden sollen.

Im Folgenden beziehen wir uns ausschließlich auf Messungen mit dem Elko II, dessen Überlegenheit gegenüber dem Pulfrich-Photometer gerade bei Serienmessungen auch für diese Methode erwiesen ist. Alle Extinktionsangaben beziehen sich auf Küvetten von 3 cm Schichtdicke sowie ein Volumen von 10 ml. Die im Elko II benutzten Filter S 53 bzw. S 75 besitzen einen optischen Schwerpunkt von 533 bzw. 746 m μ und eine Halbwertsbreite von 18 bzw. 40 m μ .

Verlauf der Eichkurve.

Die ersten Messungen mit dem Elko II zeigten, daß bei der bisherigen Versuchsanordnung eine lineare Beziehung zwischen Eiweißgehalt und Nettoextinktion nur bei Eiweißwerten bis herunter zu 100 $\mu\text{g}/10$ ml Lösungsmittel besteht. Bei niedrigeren Eiweißwerten fanden wir zunächst die Eichkurven gekrümmt, so daß ihr Anfangspunkt (B in Tafel 12, Abb. 1, Kurve a) etwa 0,0025 höher lag als nach der Verlängerung

¹⁾ An dieser Stelle sei sowohl der Deutschen Forschungsgemeinschaft wie der Deutschen Wissenschaftlichen Kommission für Meeresforschung herzlich gedankt für die Bereitstellung von Geräten und Mitteln zur Durchführung dieser Arbeiten.

ihres geraden Teiles (B') erwartet werden konnte. Diese Krümmung der Kurve a beruht auf den Werten der Eigenfärbung bei S 53 (s. Kurve b); a wird gegenüber dem gemessenen Blindwert für reine 0,2 n NaOH (=B) nach unten verschoben.

Die höhere Eigenfärbung der niedrigen Eiweißwerte bis zu 100 μg — der eine Rotfärbung zugrunde liegt — legte die Vermutung nahe, daß das hier benutzte destillierte Wasser größere Mengen von Cu enthält, das aus der Destillationsanlage stammt. Die Differenz B — B' ließ 600 — 700 μg Cu/l erwarten, die auch tatsächlich mit der photometrischen Cu-Bestimmungsmethode von H. MEYER (1938) gefunden wurden. Es muß also bereits beim Ansetzen der Eichreihen eine kleine Menge Biuret gebildet werden, bis alle Cu-Ionen verbraucht sind. Dieses unkontrolliert entstehende Biuret wird bei der Eigenfärbung und bei der Reaktionsfärbung mitgemessen und verfälscht so das Ergebnis (vgl. auch Gleichung 1). Durch Verwendung doppelt quartzdestillierten Wassers konnte dieser Fehler ausgeschaltet werden (vgl. Tafel 13, Abb. 2). Es empfiehlt sich, das quartzdestillierte Wasser in Polyäthylenflaschen aufzubewahren, sowie die 2n NaOH vor jeder Meßreihe neu anzusetzen. Ferner ist es ratsam, vor jeder Meßreihe alle Gefäße gründlich mit starker HCl zu reinigen.

Bei Verwendung Cu-freien Wassers und unter Beachtung der vorgenannten Vorsichtsmaßregeln verläuft die Eichkurve im Bereich von 0 — 3000 μg Eiweiß linear. Die Reaktionsfärbung erreicht bei 20° ihr Maximum 30 Minuten nach Reagenzzugabe und bleibt während der folgenden 60 Minuten auf derselben Höhe.

Unter Umständen kann es Schwierigkeiten bereiten, mit Cu-freiem Wasser zu arbeiten und bei den rel. hohen Cu-Konzentrationen innerhalb des Arbeitsganges die Geräte frei von Cu zu halten. In diesem Falle empfiehlt es sich, vor der Bestimmung der Eigenfärbung eine genau bemessene Vorgabe von gelöstem Albumin, z. B. 200 μg , zu jeder Probe, also auch zur Blindprobe zuzusetzen. Man vermeidet dadurch, im Bereich des gekrümmten Teiles der Eichkurve zu messen.

Besondere Fehlerquellen.

1. Die Höhe des „Blindwertes“ ist in erster Linie von der Zusammensetzung des Cu-Reagenzes abhängig, wenn man von dem Betrag, der durch eine etwaige Eiweißvorgabe entsteht, absieht. Jedoch können auch bei Verwendung desselben Reagenzansatzes unter konstanter Temperatur die Blindwerte stärker schwanken (z. B. von 0,0077 bis 0,0115 an aufeinanderfolgenden Tagen). Die Ursache dafür ist noch ungeklärt, so daß es sich empfiehlt, vor Beginn jeder Meßreihe den Blindwert neu zu ermitteln.

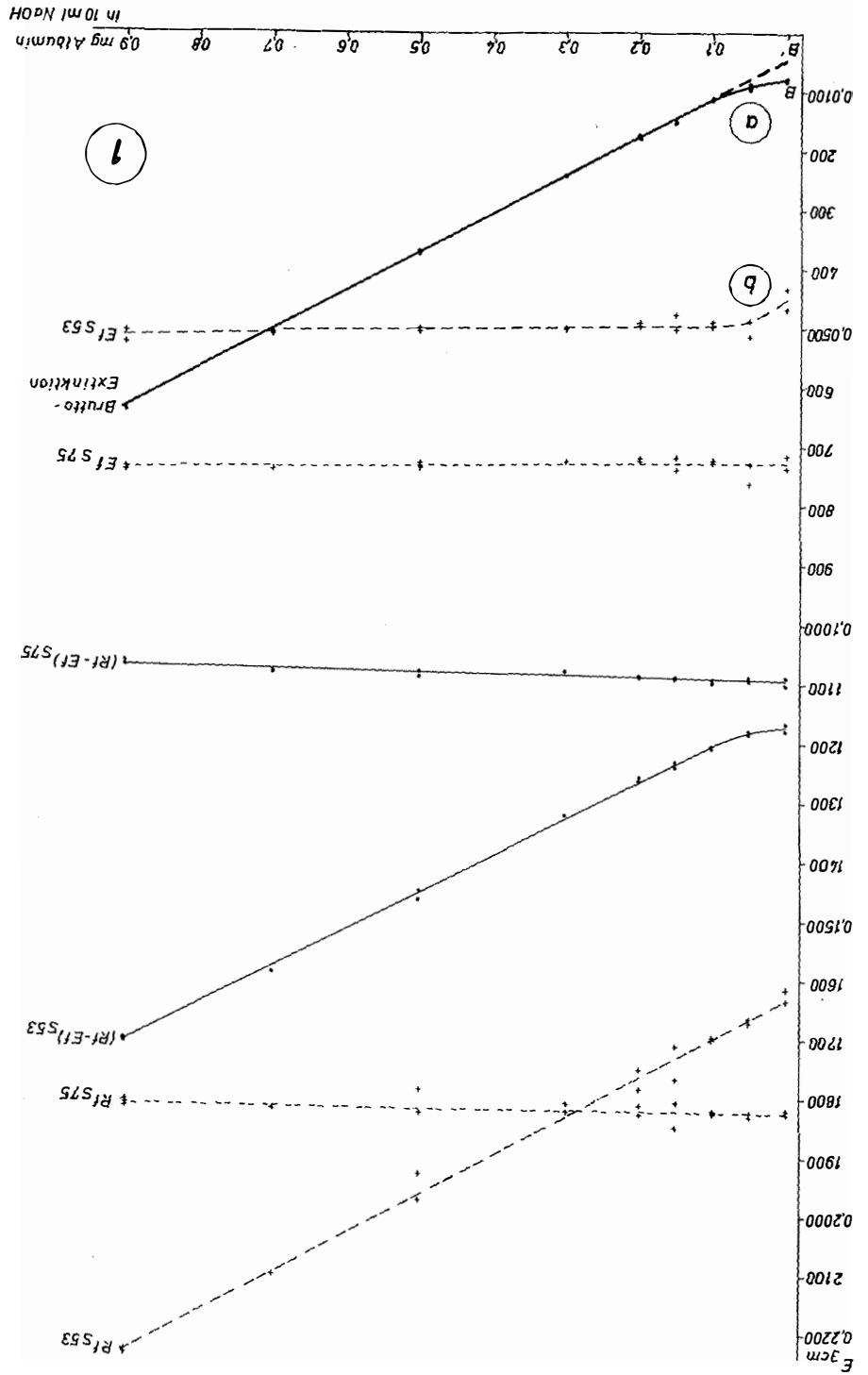
Bei Serienbestimmungen an Planktonproben wird man gewöhnlich jedoch nicht den Reagenzienblindwert für sich bestimmen, sondern damit die Erfassung des Blindwertes des unbenutzten Filters verbinden. Gegebenenfalls tritt die Messung der Extinktion der Albuminvorgabe noch hinzu. Die für die Anreicherung und Gewichtsbestimmung des Planktons verwendeten Papierfilter von Schleicher und Schüll (Nr. 575) ergeben einen Blindwert, der 10—15 μg Eiweiß äquivalent ist. Hier können Einzelwerte jedoch aus bislang ungeklärten Gründen höher liegen.

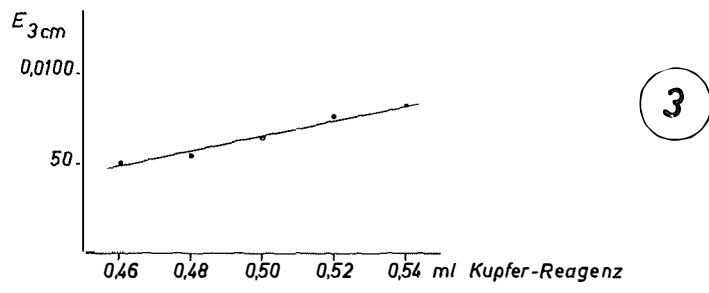
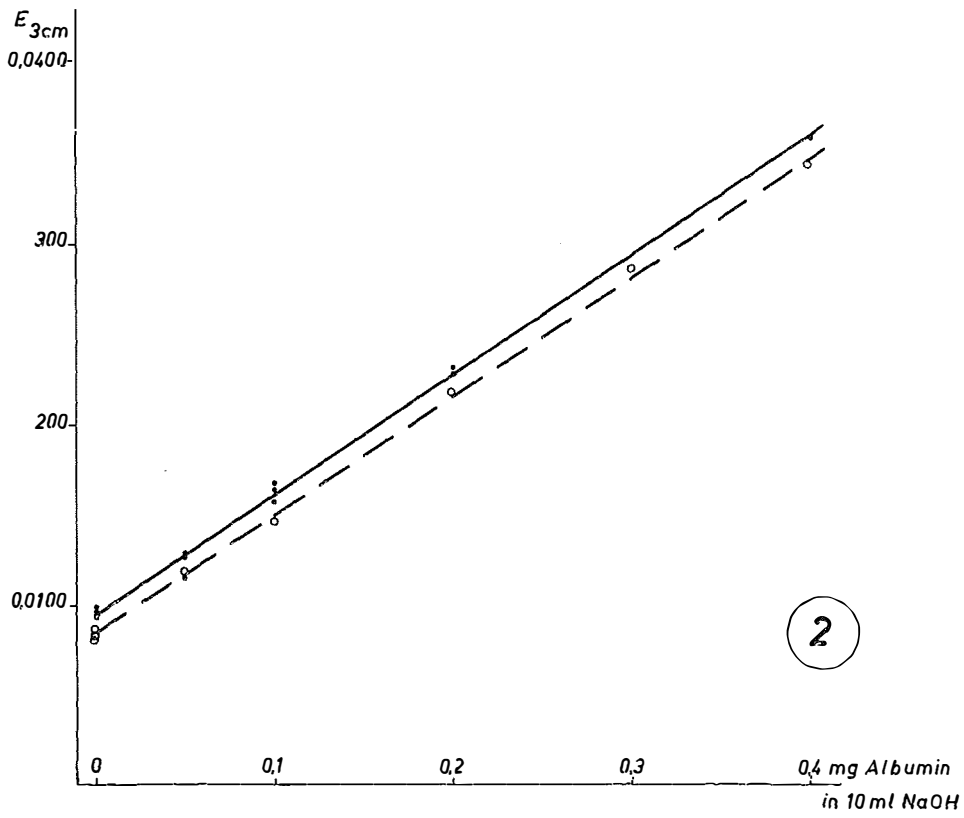
Da heute wieder Papierfilter der Vorkriegsqualität 575 erhältlich sind, braucht der 1952 vorgeschlagene Zusatz von Seignettesalz zur Verzögerung eines voluminösen Niederschlages nach Zusatz des Cu-Reagenzes jetzt nicht mehr vorgenommen zu werden. Bisher konnte eine Untersuchung darüber, wieweit Membranfilter für eine kombinierte Seston- und Eiweißbestimmung am Plankton geeignet sind, noch nicht durchgeführt

Legende zu der nebenstehenden Abbildung (Tafel 12)

Abb. 1. Darstellung der Extinktionen bei den Filtern S 75 und S 53 für die Eigenfärbung (Ef) und die Reaktionsfärbung (Rf). Eichung mit einer Albuminlösung unter Verwendung von handelsüblichem destilliertem Wasser (30. VI. 1955, t = 20°). + = gemessene Werte, . = berechnete Werte.

Tafel 12





Tafel 13

werden. Gegen deren generelle Einführung spricht nicht nur der rel. hohe Anschaffungspreis, sondern auch die Tatsache, daß von der völlig glatten Oberfläche dieser Filter die größeren Seronpartikel bei der Weiterbehandlung der Filter, z. B. bei deren Wägung, leicht herabfallen können.

Zur Gewinnung eines klaren, partikelarmen Planktonhydrolysats hat es sich als zweckmäßig erwiesen, dieses durch ein Blutzuckerfilter (Schleicher und Schüll Nr. 587 E) zu filtrieren. Diese Filter müssen jedoch vor Gebrauch etwa 12 Stunden in 0,5 n NaOH liegen und dann im Trichter mit frischer NaOH kurz ausgespült werden.

2. Die Einwirkung der Temperatur auf den Verlauf der Reaktion wurde nicht weiter untersucht (vgl. dazu KREY 1951). Es hat sich eindeutig erwiesen, daß die Cupritfärbung, die bei der Messung mit Filter S 75 erfaßt wird, temperaturabhängig ist. Bei der Messung der Reaktionsfärbung erwärmt sich jedoch die Meßflüssigkeit, so daß es notwendig ist, so schnell wie möglich die Extinktionsbestimmung für S 75 durchzuführen.

3. Während eine geringe Abweichung in der OH-Konzentration von jener der Arbeitsvorschrift für die Reaktionsfärbung unbedeutend ist, macht sich eine wechselnde Cu-Zugabe in der Reaktionsfärbung recht bemerkbar. Eine solche Abweichung wird auch durch das hier geübte Differenzverfahren nicht völlig kompensiert, weil die Extinktion des Cuprit-Komplexes bei S 53 etwas größer ist als bei S 75. Die Tafel 13, Abb. 3 zeigt, wie die Extinktion durch steigende Reagenzzugaben beeinflusst wird. Wenn man z. B. anstelle der vorgeschriebenen 0,50 ml Cu-Reagenz 0,51 ml zufügt, so entspricht dies beim Blindwert im Endergebnis einem Fehler von + 0,0004 Extinktionseinheiten, d. i. etwa 6 µg Eiweiß. Um bei den Serienmessungen einen Fehler in der Zugabe von Reagenz nachträglich zu kompensieren, muß man bei der Berechnung der Ergebnisse die Differenz Rf 75—Ef 75 bilden. Weicht eine Differenz vom Mittel aller Bestimmungen um + 0,0030 ab, so ist das Ergebnis um —0,0005 zu berichtigen. Es muß aber darauf hingewiesen werden, daß bei hohen Albuminwerten der Cu-Überschuß geringer und daher auch die Extinktionsdifferenz bei Filter S 75 kleiner wird. Die Korrektur von Abweichungen unter 0,0025 erübrigt sich, da andere unkontrollierte Fehler größer sein können.

4. Bei den Analysen von Planktonproben werden im Regelfalle etwa 0,05 bis 0,5 mg Eiweiß mit 1 ml 2 n NaOH hydrolysiert. Bei der Eichlösung sind jedoch bisher 10 mg Eiweiß in der gleichen Menge NaOH gelöst worden. Um zu untersuchen, ob diese hohe Konzentration, die bei den Eichserien benutzt wird, repräsentativ sein kann, wurden 1—10 mg Eiweiß in jeweils 1 ml 2 n NaOH gelöst und von diesen Lösungen eine Eichreihe aufgenommen. Eine Veränderung der Eichwerte trat nicht ein, sodaß wir das gleiche auch für geringere Eiweißmengen annehmen dürfen und am alten Verfahren festhalten. Es sei jedoch nochmals darauf hingewiesen, daß die Höhe der Eiweißwerte von der Einwirkungszeit der 2 n NaOH abhängt. Bei 20° ergibt sich bei unserem Albuminpräparat (vgl. S. 35) innerhalb 6—36 Stunden eine Verminderung des Eichwertes um 3%, wenn man die NaOH 12 Stunden länger einwirken läßt. Das Absinken der Eiweißwerte nach der Verdünnung auf eine Konzentration von 0,2 n NaOH verläuft jedoch wesentlich langsamer als in der Arbeit von 1951 angegeben wurde. Dieses konnte durch neue Bestimmungen an chloroformierten Lösungen festgestellt werden.

Die Eichwerte, die sich aus demselben Präparat, jedoch in verschiedenen Ansätzen ergeben, variieren etwas. Aus 17 Einwaagen, von denen jeweils 3 Bestimmungen durch-

Legenden zu den nebenstehenden Abbildungen (Tafel 13)

Abb. 2. Bruttoextinktionskurven von zwei Eichungen mit Albumin unter Verwendung kupferfreien destillierten Wassers.

———— gemessen am 19. V. 1956, t = 19°
- - - - - gemessen am 21. XII. 1956, t = 20°

Abb. 3: Bruttoextinktion einer Blindprobe nach Zugabe verschiedener Mengen von Kupferreagenz.

geführt wurden, ergab sich im Mittel ein „Kennwert“ für 1 mg Eiweiß von $0,0680 \pm 0,0003$. Der mittlere Fehler der einzelnen Einwaagen betrug dabei $0,0013$ Extinktionseinheiten. Die Streuung ist wesentlich geringer als in der ersten Arbeit angegeben, sodaß sich das tägliche Ansetzen einer neuen Eichreihe erübrigt. Man rechnet besser mit einem Mittelwert, der für das entsprechende Gerät einmal bestimmt worden ist und muß dann freilich darauf achten, daß die Temperatur während der Messungen gleich bleibt.

Das Seston und damit auch das Planktongewicht wird aus verschiedenen verfahrenstechnischen Gründen nur lufttrocken angegeben. Nun liegt es nahe, auch das Albuminäquivalent auf die lufttrockene Einwaage der pulverisierten Eichsubstanz zu beziehen. Da man jedoch mit diesem Albuminäquivalent nur einen Relativwert bestimmt, kann man der Eichung sehr gut auch die bei 110° vorbereitete und im Exsikkator über Silikagel getrocknete Substanz zugrunde legen. So erhält man für festgelegte Analysenbedingungen einen reproduzierbaren Eichwert. Der Eichwert, der bislang mit $0,0600/1$ mg Albumin (lufttrocken) als Berechnungsgrundlage gebraucht wurde, wird in Zukunft durch $0,0680/1$ mg Albumin (trocken) ersetzt, wie es auch BANSE (1956) schon getan hat.

Albuminäquivalent

Die Biuretmethode gibt nicht unmittelbar eine Menge von lebendem Eiweiß im Plankton wieder, sondern nur ein Maß für die Menge der im getrockneten Plankton vorgefundenen Peptide. Der bei dieser Reaktion der Planktonpeptide entstehende Farbwert wird mit demjenigen verglichen, den ein gleichbehandeltes Albumin aus Eiern ergibt. Es wird dabei die Annahme gemacht, daß die Zerfallsgeschwindigkeit des Plankton-eiweißes in 2 n NaOH ebenso groß ist wie die des in gleicher Weise behandelten, in sich aber homogeneren Albumins, das als Standard dient. Es muß hier nochmals betont werden, daß mit dieser Eiweißbestimmungsmethode nur ein Albuminäquivalent ermittelt werden kann. Laufende Untersuchungen über das Verhältnis von Gesamtstickstoff und Albuminäquivalent im getrockneten Plankton, die gleichzeitig mit Bestimmungen von organischer Substanz und Phosphor in Plankton von möglichst einheitlicher Zusammensetzung durchgeführt werden, deuten auf erhebliche Unterschiede in einzelnen Planktongruppen hin. Auch bedarf es in diesem Rahmen einer eingehenden Untersuchung, welcher Anteil des Gesamt-N in freien Aminosäuren sowie anderen organischen N-haltigen Substanzen vorliegt, die nicht von der Biuretreaktion erfaßt werden können und auch nicht unmittelbar zum „lebenden Eiweiß“ gehören, das mit dieser Methode bestimmt werden soll. Diese Untersuchungen werden sich jedoch noch über längere Zeit hinziehen, da hierfür ein größeres Vergleichsmaterial mit Analysen mehrerer Komponenten bearbeitet werden muß.

Genauigkeit der Methode

Mit unserer Meßanordnung (vgl. S. 35 und S. 36) beträgt der mittlere Fehler der Einzelmessung z. B. bei einer Untersuchung von einem reinen Eiweißpräparat $\pm 0,0005$ Extinktionseinheiten, d. i. $\pm 7\mu\text{g}$ Eiweiß ($n = 15$). Hierbei wurde aus einer Lösung, die $500\mu\text{g}$ Albumin/ml enthielt, 15 mal 1 ml abpipettiert. Der Auslauf-fehler der Pipette dürfte dabei nur den geringeren Teil der Streuung ausmachen. Der Fehler, der durch das Elko entstehen kann, ist völlig zu vernachlässigen, da sich bei sehr sorgfältigem Arbeiten dessen Meßfehler in den Grenzen von $\pm 1\mu\text{g}$ Albumin bewegt. In einer weiteren Vergleichsreihe wurden 19 Parallelproben untersucht, deren Hydrolysat durch ein Filter 587 E filtriert wurde. Dabei ergab sich ein mittlerer Fehler von $\pm 10\mu\text{g}$ Albumin. Der eigentliche apparative Meßfehler hat also im Vergleich zu den sonstigen Störungen einen verschwindend geringen Einfluß. Wesentlich für die Größe des mittleren Fehlers ist dagegen die Sorgfalt bei der Probenahme — wobei

man auch an die Cu-haltigen Korrosionsprodukte mancher Wasserschöpfer denken muß — sowie bei den verschiedenen analytischen Manipulationen im Laboratorium. Man wird kaum erreichen, daß bei Arbeiten an Bord die hier aufgeführte Fehlergrenze von 10 µg Eiweiß erreicht werden kann; deshalb führt man die Eiweißanalysen am besten an den scharf getrockneten Planktonproben an Land durch. Gut getrocknetes Plankton behält mehrere Jahre den gleichen Wert für das Albuminäquivalent.

In Anbetracht aller Voraussetzungen darf man für diese Methode eine Fehlerbreite von $\pm 10 \mu\text{g}$ Albumin innerhalb des Bereiches von 0 bis 3000 µg Albumin angeben.

Procedure

1. Hydrolysis. Plankton concentrated by nets or paper-filters is preserved for a long time by drying. For analysis 1 ml 2n NaOH is added to the plankton sample in a small vessel, which is kept closed for 12 hours at room temperature. Then 3—4 ml copper-free distilled water is added. This solution is filtered e. g. through filter paper Schleicher & Schüll Nr. 587 E, which has been kept for 12 hours in 0.5 n NaOH. The filtrate is collected in a calibrated tube of 11 ml and brought up to 10 ml by adding copper-free water.

When contamination by copper from distilled water or vessels is not to be prevented, an amount of about 200 µg albumen is added to samples and blanks.

2. Colour of pure solutions. Before adding copper-reagent, absorbancies at 750 and 530 mµ are taken. The solutions are returned to the calibrated tubes. If no great difference in albumen-content is expected, intermediate rinsing of photometer-cuvettes by 0.2 n NaOH is not to be recommended.

In the "Elko II" a light path of 3 cm was found to be sufficient, especially for the volume of 10 ml available. Generally the readings on the red scale are sufficient giving directly the extinction up to an accuracy of 0.0001. For standardisation the black readings allowing an accuracy up to 0.01% = 0.0001 extinction are to be converted into absorbancies.

3. Colour of reaction. 0.5 ml copper-reagent is added per sample and distributed well by shaking the tube. After 30 min. the increased optical density is measured at 750 and 530 mµ. The maximum of colour is present during the next 60 min. at room temperature. The readings at 750 mµ are quickly rised by increasing temperature. Great care should be taken on this point.

In order to empty the cuvettes a fine drawn pipe connected with a vakuum pump at a tap was found to qicken the process of consecutive work.

4. Reagent blank. Procedures 2 and 3 are to be repeated with blank filters, whenever filters have been used in the course of analysis. If not, the procedure has to be repeated with a pure solution of 0.2 n NaOH.

5. Calculation. Calculation is done by values of absorbancy.

Sample: $(Rf - Ef)_{530} - (Rf - Ef)_{750} = \text{Bruttoextinction}$

Blank: is the same way

Net-extinction = Bruttoextinction — blank

Ef = extinction of pure solution; Rf = extinction of solution with copper reagent added.

"Kennwert" = Net-extinction of 1 mg albumen.

Differences $(Rf_{750} - Ef_{750})$ remain constant with one reagent and normal albumen values. Deviations from the mean difference may be caused by faulty addition of copper-reagent and may become corrected (cf. p. 37).

6. Standardisation. For standardisation 5 ml 2 n NaOH are added to 50 mg albumen. 12 hours later the solution is made up to 50 ml with copper-free distilled water. Sometimes filtration is necessary (cf. No. 1). After adding chloroform this solution is kept

stable for some days. It is proposed to take for a standardisation range the following quantities : 0, 0.05, 0.10, 0.15, 0.20, 0.30, . . . 1.0 ml = mg albumin, making these up to 10 ml with 0.2 n NaOH. The estimation follows No. 2—5. The calibration curve at low figures is straight only when copper-free distilled water is used, otherwise cf. No. 1.

The "Kennwert" is found to be 0.0680 / 3 cm and 1 mg dry albumen per 10 ml in the "Elko II". The calibration curve is straight at least up to 3 mg albumen per 10 ml. The accuracy obtained in the "Elko" with plankton samples is $\pm 10 \mu\text{g}$ albumen. Working with the Pulfrich-Photometer, the conditions are quite similar, only the accuracy is not as high as in the "Elko II".

7. Reagents:

2 n NaOH: This solution is diluted to 0.2 n by copperfree distilled water for the determination of reagent blank and standardisation.

Copper-reagent: 2 g CuSO_4 cryst. per 100 ml water; add 60 ml of this solution to 50 ml of Ethylene-glycol ($\text{HO CH}_2 \text{CH}_2 \text{OH}$)

"Albumin aus Eiern" (Merck).

"Seignettesalz" = $\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6$

Copper-free distilled water.

8. Interferences. At the beginning of the analyses the filterpapers have to be examined. A voluminous precipitate, sometimes following the addition of copper-reagent, may become dissolved by Seignette salt (cf. KREY 1952). Special care should be taken to handle all samples in the same way under hydrolysis, estimation and standardisation, both in regard to time and temperature.

Literaturverzeichnis

BANSE, KARL: Produktionsbiologische Serienbestimmungen im südlichen Teil der Nordsee im März 1955. Kieler Meeresforschungen, Vol. 12, 1956. — KREY, JOHANNES: Quantitative Bestimmungen von Eiweiß im Plankton mittels der Biuretreaktion. Kieler Meeresforschungen, Vol. 8, 1951. — KREY, JOHANNES: Die Untersuchung des Eiweißgehaltes an kleinen Planktonproben. Kieler Meeresforschungen, Vol. 8, 1952. MEYER, HELGA: Die photometrische Bestimmung des Kupfers im Seewasser. Annalen der Hydrographie und maritimen Meteorologie, 1938. — ZEISS, Gebrauchsanweisung für das Elko II. Oberkochen, 1953.