

short exposures of either intact PMN cells or isolated PMN lysosomes.

While the response of lysosomes to specific stimuli may differ from one tissue to another, lysosomes isolated from rat liver and rat kidney release identical amounts of enzyme during incubation in oxygen as in nitrogen^{11,12}. In view of this fact and the results described in the present report, it is unlikely that direct release of lysosomal enzymes by oxygen is the primary lesion of oxygen poisoning, either in tissues of intact animals or in isolated cells. It is possible, of course, that lysosomal damage may occur as part of a complex reaction to the stress associated with exposure of animals to high pressure oxygen. However, the observation that such damage temporally precedes other biochemical lesions does not justify the conclusion that it causes them. The same comment applies for cells grown in oxygen; lysosomal damage in HeLa cells, for example, can hardly qualify as a primary injury when it is preceded (apparently by many hours) by impairment of DNA synthesis^{1,13,14}.

Zusammenfassung. Es wird nachgewiesen, dass hyperbare O₂-Behandlung die Freisetzung von Sulfatase aus lysosomen, beziehungsweise neutrophilen Leukozyten nicht beeinflusst.

J. W. HARRIS

Laboratory of Radiobiology, University of California Medical Center, San Francisco (California, USA), 19th June 1967.

¹¹ C. DE DUVE and H. BEAUFAY, Biochem. J. 73, 610 (1959).

¹² C. B. SLEDGE and J. T. DINGLE, Nature 205, 140 (1965).

¹³ R. M. DREW, R. B. PAINTER and L. E. FEINENDEGEN, Expl Cell Res. 36, 297 (1964).

¹⁴ This research was supported by a Postdoctoral Fellowship from the Australian Institute of Nuclear Science and Engineering. Sincere thanks are due to the Cancer Institute, Melbourne, Australia, for use of laboratory facilities and to Dr. H. A. S. VAN DEN BRENK for helpful discussions during preparation of this manuscript.

PRO EXPERIMENTIS

Densitometrische Bestimmung von Proteinen in kleinen Volumen

Das Bindungsvermögen der Proteine für einige Farbstoffe wird in bedeutendem Massse zu deren quantitativer Detektion ausgenützt, vor allem bei der Färbung verschiedener histologischer Präparate und bei der Sichtbarmachung von Elektrophoreogrammen. Bei der Anwendung von Amidoschwarz ist die Intensität der Färbung gegen die Menge der vorhandenen Eiweisskörper sehr empfindlich; es bietet sich dadurch eine Möglichkeit, die Proteinkonzentration in verhältnismässig sehr geringen Volumen der zu analysierenden Lösungen schnell zu bestimmen. Die Verfasser befassten sich eingehender mit diesem Problem und beschreiben in der vorliegenden Arbeit eine semiquantitative Methode zur Proteinbestimmung anhand der Färbungsintensität von Farbtesten in Agar.

Eine 1%ige Agarösung in 0,1 N NaOH wird heiß auf ein vollkommen entfettetes mikroskopisches Trägerglas aufgetragen. Nach Ablauf von 30 min werden auf die Oberfläche der ungefähr 2 mm dicken erstarrten Agarschicht die Proben durch Verdrängen eines bekannten Volumens der untersuchten Lösung aus einer kalibrierten Mikropipette aufgetragen. Das Auftragen der Proben kann mit Vorteil mittels einer Einrichtung ausgeführt werden, die in Figur 1 schematisch dargestellt ist. Die Mikropipette ist vertikal über dem Trägerglas angebracht und deren Bewegung in vertikaler und horizontaler Richtung wird von einer Mikroverschiebungsvorrichtung beherrscht. Durch die Wahl eines genügend kleinen Durchmessers der Mikropipette können auf diese Weise Volumen bis zu einer Ordnung von 10⁻³ ml aufgetragen werden. Geringere Volumen bleiben unter der Einwirkung kapillarer Kräfte am äusseren Mantel der Pipette haften und dies kann auch durch weitere Veränderungen der geometrischen Dimensionen nicht verhindert werden. Die Kalibrierung kann durch radiometrische Bestimmung der Aktivität eines gegebenen Volumens der Lösung eines radioaktiv markierten Präparates, im gegebenen Falle

Na₂HP³²O₄, durch Verdrängung aus einer bis zum vorgegebenen Strich gefüllten Pipette ausgeführt werden.

Nach dem Auftragen der Proben wird das Trägerglas unter eine mit einem Chlorkalziumröhrenchen versehene Glasklocke gelegt, die zugleich das Absetzen mechanischer Verunreinigungen aus der Atmosphäre verhindert, und die Agarschicht wird bei Raumtemperatur vollständig ausgetrocknet. Im Laufe des langsamen Trocknungsprozesses diffundiert das Protein in die Agarschicht ein, die im trockenen Zustand zu einem gegen mechanische Einflüsse verhältnismässig resistenten Film wird. Nach dem Austrocknen wird das Trägerglas in die Färbungslösung gelegt (1% Amidoschwarzlösung in einer 3%igen Essigsäurelösung), und nach dem Anfärben wird der

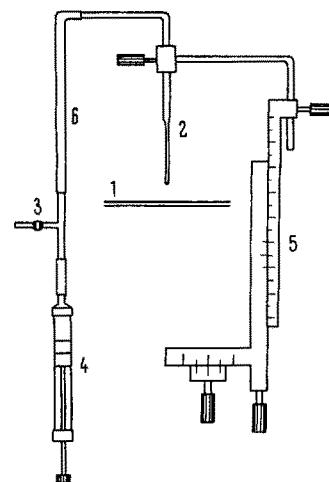


Fig. 1. Manipuliervorrichtung zur Auftragung von Proben. (1) Trägerglas mit Agar, (2) kalibrierte Mikropipette, (3) Entlüftung, (4) Injektionsspritze, (5) Mikroverschiebvorrichtung, (6) Gummivverbindung.

überschüssige Farbstoff durch Auslaugen in 3%iger Essigsäure entfernt. Die Farbintensität wird danach mittels eines Densitometers gemessen. Im gegebenen Falle wurde das Schnellphotometer Carl Zeiss, Jena, angewandt.

Die Gesamtmenge der gelösten Substanz im Farbtest wird in mg eines beliebig gewählten, gut löslichen

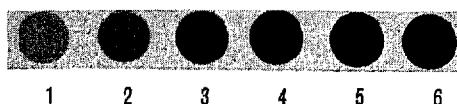


Fig. 2. Teste verschieden konzentrierter Albuminlösungen. (1) $0,50 \times 10^{-3}$ g/ml, (2) $0,75 \times 10^{-3}$ g/ml, (3) $1,00 \times 10^{-3}$ g/ml, (4) $1,25 \times 10^{-3}$ g/ml, (5) $1,50 \times 10^{-3}$ g/ml, (6) $1,75 \times 10^{-3}$ g/ml.

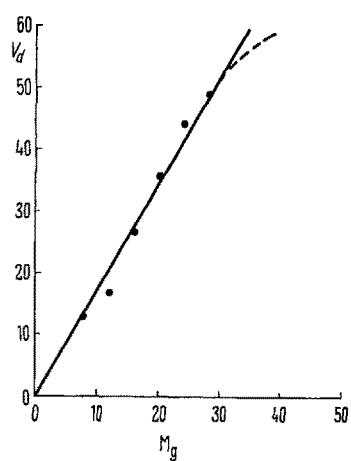


Fig. 3. Kalibrierkurve. M_g , Proteingesamtmenge in 1 Test des Volumens $1,6 \times 10^{-3}$ ml in $g \times 10^{-3}$; V_d , ml.

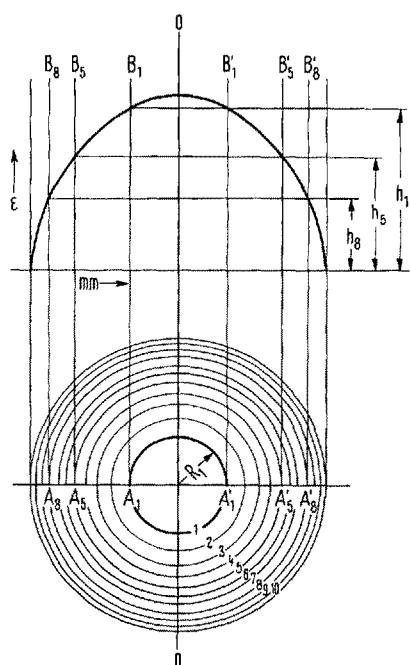


Fig. 4. Schema der graphischen Integrierung der densitometrischen Kurven. S_c , $7,065 \text{ cm}^2$.

Standardproteins durch Ablesen aus einer Kalibrierkurve (Figur 3) bestimmt, welche die graphische Abhängigkeit des Volumens des sogenannten «densitometrischen Zylinders» V_d von der Menge des Standardproteins M_g ausdrückt. Das Volumen V_d wird durch die graphische Integrierung der densitometrischen Kurve bestimmt (mittels einer Modifizierung der Integrationsmethode nach EDSTRÖM¹), wie es in Figur 4 schematisch dargestellt ist. In dem System konzentrischer Kreise sind die Halbmesser R derart gewählt, dass die Flächen der einzelnen Zwischenkreisflächen gleich und mit der Fläche S_c des mittleren Kreises mit dem Halbmesser R_1 identisch sind. Die Vertikalen AB und A'B' scheiden die densitometrische Kurve in verschiedene Höhen h_1, h_2, \dots, h_n und das Volumen V_d wird dann durch das Produkt der Summe dieser Höhen und der Fläche des mittleren Kreises bestimmt, so dass die einfache Beziehung

$$V_d = \sum h S_c \quad (1)$$

gilt. Der Wert des Volumens V_d ist in einem gewissen Konzentrationsbereich der Gesamtmenge der im untersuchten Volumen V_t enthaltenen Menge M_g des Standardproteins direkt proportional. Es gilt also

$$M_g/V_d = K = c_t V_t/V_d, \quad (2)$$

wobei c_t die betreffende Konzentration ist. Die Richtlinie der Kalibrierkurve entspricht also der Konzentration c_d einer Lösung, in der die Proteingehalt M_g im Volumen V_d gelöst wäre, sie drückt also die sogenannte spezifische

Tabelle I. Angaben für die Konstruktion der aus den densitometrischen Kurven verschieden konzentrierter Albuminlösungen berechneten Kalibrierkurve ($V_t = 1,6 \times 10^{-3}$ ml)

$c \times 10^3$ g/ml	$\sum h$ cm	V_d ml	$M_g \times 10^7$ g	$c_d \times 10^3$ g/ml
0,50	17,27	122	8,0	6,55
0,75	22,91	161	12,0	7,45
1,00	38,49	272	16,0	5,84
1,25	50,62	357	20,0	5,60
1,50	63,06	445	24,0	5,39
1,75	69,51	491	28,0	5,70
Durchschnitt				6,09

Tabelle II. Bestimmung des Proteingehaltes im Extrakt eines peripheren Nervs ($V_t = 1,6 \times 10^{-3}$ ml)

$\sum h$ cm	V_d ml	$M_g \times 10^7$ g	$c \times 10^3$ g/ml
54,23	383	23,32	1,45
56,52	399	24,29	1,52
55,85	395	24,05	1,50
53,92	381	23,20	1,43
56,80	402	24,48	1,53
57,00	403	24,54	1,53
Durchschnitt			1,49

¹ J. E. EDSTRÖM, *Microextraction and Microelectrophoresis for Determination and Analysis of Nucleic Acids in Isolated Cellular Units* (Methods in Cell Physiology, Academic Press, New York 1965).

Konzentration des «densitometrischen Zylinders» c_d aus und es gilt $c_d = \text{konst.}$

Die Verfasser wählten Albumin als Standardprotein. Die densitometrischen Kurven verschieden konzentrierter Lösungen sind in Figur 2 dargestellt. Die Versuchswerte sowie die berechneten Werte für die Konstruktion der

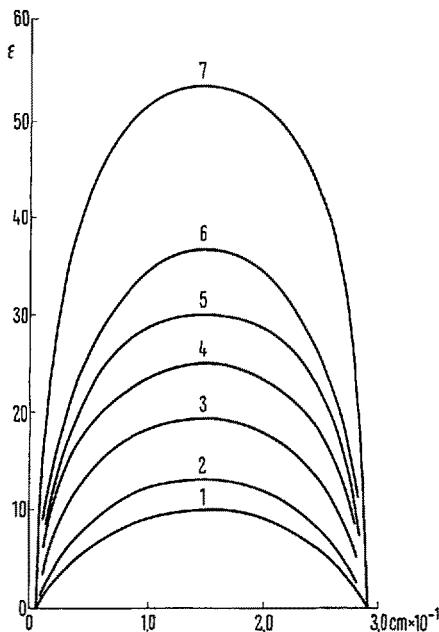


Fig. 5. Densitometrische Kurven der Teste verschieden konzentrierter Albuminlösungen. (1)–(6) wie in Figur 2 angeführt, (7) = $2,2 \times 10^{-3}$ g/ml.

Kalibrierkurve in Figur 3 sind in der Tabelle I zusammengefasst. Die Werte h wurden mittels einer Millimeterskala bestimmt, an welcher 30 mm 10 Strichen der Densitätskala entsprechen.

Tabelle II führt als Beispiel die Ergebnisse der Bestimmungen des gesamten Proteingehaltes in Extrakten eines peripheren Nervs, *nervus ischiadicus*, an, die durch Extraktion von 28 mg des operativ entnommenen Nervs in 2 ml physiologischer Kochsalzlösung dargestellt worden waren. Aus einem Volumen von 0,8 ml des entfetteten Extraktes wurden einerseits 5 Parallelmessungen mittels der oben beschriebenen Methode ausgeführt, andererseits wurde eine Bestimmung nach FOLIN² unternommen. Der durch densitometrische Messungen gewonnene Durchschnittswert (c_x , $1,49 \times 10^{-3}$ g/ml) stimmt sehr gut mit dem kolorimetrisch bestimmten Wert ($1,78 \times 10^{-3}$ g/ml) überein. Die Genauigkeit der Messung wurde anhand der Standardabweichung beurteilt, die in diesem Falle $0,0136 \times 10^{-3}$ beträgt.

Summary. An analytical method of quantitative determination of proteins in small volumes is described. The method is based upon the densitometric evaluation of colour tests in agar-gel. The quantity of proteins is determined by graphical integration of densitometric curves and, in the arrangement described, it is possible to assay proteins in volumes of the order 10^{-3} ml.

J. SPURNÝ und B. JAKOUBEK

Physiologisches Institut der Tschechoslowakischen Akademie der Wissenschaften, Prag (CSSR),
16. Mai 1967.

² H. LOWRY, N. J. ROSEBROUGH, A. Z. FARR und R. J. RANDALL, J. biol. Chem. 193, 263 (1951).

Marking of Chloroplast Galactolipids with Tritium

Galactose oxidase (D-galactose: O₂ oxidoreductase, EC 1.1.3.9) acts on D-galactose, 2-D-glucosamine and many galactosides, to form D-galactohexodialdose or aldosides¹. The aldehyde group formed by the action of this enzyme can be subsequently reduced back to reform the initial galactoside. Use of tritiated borohydride for this reduction was suggested² as a procedure for the preparation of ³H-labelled galactose and galactosides such as oligosaccharides², glycoproteins³ and cerebrosides⁴. The same enzyme reaction was also employed in a histochemical staining method to show presence of terminal galactose and galactosamine units in mucus-secreting cells⁵.

We have recently attempted to apply the galactose oxidase reaction in studies of ultrastructure as a means for the identification of galactosides in various biological membranes. For this purpose, the enzyme-oxidized structures were reduced by NaB³H₄ and then studied by radioautography in the electron-microscope.

It is well known that galactolipids constitute a major portion of the lipid fraction of the chloroplast membrane⁶.

In the present report the use of the galactose oxidase reaction is suggested as a possible procedure for their ultrastructural analysis and detection. We feel that the method as described here, or in other variations which can be applied, provides a useful tool for studies on the appearance, turnover and other metabolic aspects of galactolipids in the chloroplast membrane.

Experimental⁷. Washed Swiss chard leaves were disintegrated in a Waring blender for 15 sec in 0.2 M phosphate buffer pH 7.0, containing 0.4 M sucrose. The fraction containing chloroplasts⁸ was collected by centrifugation between 200 and 1000 g. The chloroplasts were thrice washed in the same sucrose buffer solution, dispersed in it to 15% (v/v) suspension, then treated with a glutaraldehyde solution (4% final concentration) prepared in 0.2 M phosphate buffer pH 7.0. After 160 min at 4°C, the chloroplasts were washed 5 times with 20 volumes of buffer to remove excess aldehyde, then suspended in 2% NaB³H₄ solution at room temperature. Two h later the chloroplasts were washed again with the same buffer and dispersed to about 15% (v/v) suspension in a solution containing 200 units galactose oxidase and 450 units catalase/ml in 0.2 M phosphate buffer, pH 7.0. After 5 h at 25°C, NaB³H₄ (100 µc/µmole) was added to a final con-