

Anwendung der stopped-flow Technik für kurze Puls-Inkubation von Zellsuspensionen und Mikroorganismen

Construction of a Stopped-Flow Apparatus for Short Time Pulse-Incubation of Microorganisms and Cell Suspensions

P. L. SCHELL

Institut für Klinische Biochemie und Physiologische Chemie der Medizinischen Hochschule Hannover (Direktor: Professor Dr. W. LAMPRECHT)

(Z. Naturforsch. 26 b, 174—175 [1971]; eingegangen am 1. Dezember 1970)

Die Aufnahme von RNS durch lebende Ehrlich-Ascites-Tumorzellen verläuft schon bei 0° derart schnell, daß mit einer normalen Inkubationstechnik keine Null-Werte erhalten werden konnten^{1, 2}. Deshalb wurde eine einfache Misch-Apparatur gebaut, die Inkubationen von derartigen Zellsuspensionen bis herunter

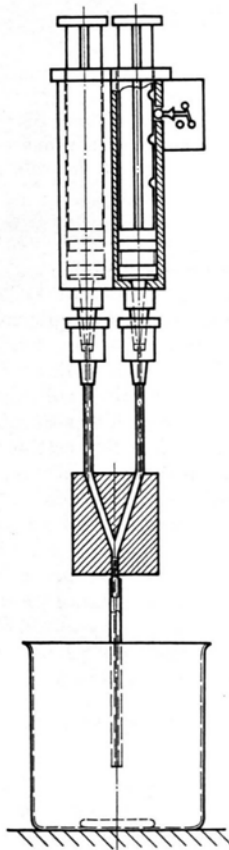


Abb. 1. Apparat.

Sonderdruckanforderungen an P. L. SCHELL, Institut für Klinische Biochemie und Physiologische Chemie der Medizinischen Hochschule Hannover, D-3000 Hannover-Kleefeld, Roderbruchstr. 101.

¹ P. L. SCHELL, Z. Naturforsch. 22 b, 529 [1967].

zu Zeiten von 10 msec möglich macht. Im folgenden soll der Bau dieser Apparatur und ihrer Funktionskontrolle beschrieben werden, da das Verfahren auch für andere Zellsuspensionen sowie für Mikroorganismen anwendbar erscheint.

Wie aus Abb. 1 (Abbildungsmaßstab 1 : 2) ersichtlich, wurden zwei 2-ccm-Einmalinjektions-Spritzen aus Polyäthylen so angeordnet, daß sie manuell gleichzeitig in eine y-förmige Mischanordnung entleert werden konnten^{3, 4}. Die eine Spritze enthielt in unserem Fall eine Suspension von Asciteszellen im Inkubationsmedium (0,5 ml) in zweifacher Konzentration aber in Abwesenheit von RNS, wogegen die andere Spritze RNS in doppelter Konzentration im Inkubationsmedium enthielt (0,5 ml)⁵. Beim gleichzeitigen Entleeren der Spritzen bildet sich das vollständige System ($3 \cdot 10^7$ Zellen/ml) im Mischpunkt, um von dort durch den Arm 3 der Apparatur in ein intensiv gerührtes Verdünnungsbad gedrückt zu werden (0,9-proz. Kochsalz-Lösung). Die Inkubation wird durch das Ausverdünnen gestoppt. Die Inkubationszeit ist durch die Einspritzzeit und das Verhältnis der Querschnittsfläche des 3. Armes zur Summe der Querschnittsflächen der beiden Spritzenlumina und durch die Länge des 3. Armes gegeben. Durch den Mikroschalter am Oberteil der einen Spritze, der das Vorbeilaufen von Nuten registriert, die sich am Pumpenkolben befinden, ist die Möglichkeit zur elektrischen Zeitmessung gegeben. Wie aus Abb. 1 ersichtlich, waren Nuten bei den Volumina 0 ml und 0,5 ml angebracht.

Für die hier beschriebene Anwendung der Mischtechnik auf Zellsuspensionen mußten verschiedene Kriterien berücksichtigt werden.

Inkubationsmedium (nach der Mischung) Poly A · (³ H-U) ₂	Inkubationszeit	Inkubationstemperatur [°C]	Aufnahme von Poly A · (³ H-U) ₂ in die intakte Zelle [ipm]
0,035 μMol/ml			
$6,2 \cdot 10^5$ ipm/ml	10 msec	0	780
$4,5 \cdot 10^7$ Zellen pro ml	1 min	0	5300

Tab. 1. Kurzzeitinkubation von Ehrlich-Ascites-Tumorzellen mit Poly A · U₂. Zweifach konzentriertes Inkubationsmedium und zweifach konzentrierte Zellsuspension wurden behandelt wie im Text beschrieben und dabei mit 15 ml physiologischer Natriumchlorid-Lösung verdünnt. Nach Zentrifugation bei 30 g 0° 20 min wurden die sedimentierten Zellen noch zweimal in gleicher Weise durch Sedimentieren gewaschen und dann aus 2,5 ml physiol. Natriumchlorid-Lösung auf Glasfaserfilter auffiltriert und gemessen wie zuvor beschrieben⁵. Da die Probe das dreifache Volumen und die dreifache Anzahl Zellen hat, müssen die Ergebnisse auf die Standardprobengröße umgerechnet werden. Als Kontrollwert ist eine Standardinkubation bei 0° 1 min aufgeführt.

² P. L. SCHELL, Z. Naturforsch. 22 b, 995 [1967].

³ B. CHANCE, Biochem. J. 46, 387 [1950].

⁴ B. CHANCE, Rev. sci. Instruments 22, 619 [1951].

⁵ P. L. SCHELL, Z. Naturforsch. 23 b, 117 [1968].

⁶ W. H. MÜLLER u. P. L. SCHELL, in Vorbereitung.

1. Es mußte sichergestellt werden, daß durch hydrodynamische Scherkräfte die Zellen nicht zerstört wurden. Es zeigte sich, daß bei den verwendeten Materialien bis zu einer Einspritzzeit von ca. 0,8 sec (ca. 10 msec Inkubationszeit) eine derartige Zerstörung nicht in Erscheinung trat. Das wurde durch Zählen der Zellen in einer Neubaur-Kammer vor und nach der Passage durch die Apparatur gezeigt. Außerdem wurden unter dem Mikroskop keine Zelltrümmer gefunden. Die Vitalität derartig behandelte Zellen konnte durch erfolgreiche Implantation sowie durch spezielle Färbung mit Eosin⁶ gezeigt werden.

2. Um sicher zu sein, daß in der beschriebenen Anordnung eine gleichmäßige, maximal gute Mischung stattfand, wurde das System in üblicher Weise entleert und die strömende Mischung durch die Durchflußkuvette eines Zeiss PMQ 2-Spektrometers geleitet und die Licht-

absorption bei 500 m μ gemessen und aufgezeichnet. Die Geringfügigkeit der Schwankungen der Lichtabsorption (1% innerhalb von 1 sec) weist auf die Homogenität bzw. gute Durchmischung der strömenden Flüssigkeit hin. Die Zellsuspension war in dieser Anordnung gegenüber dem normalen Inkubationsversuch um den Faktor 1 : 5 verdünnt. In Tab. 1 sind als Beispiel die experimentellen Ergebnisse einer Kurzzeitinkubation von Asziteszellen in einem Medium enthaltend Poly A \cdot U₂ aufgezeichnet. Da Ehrlich-Ascites-Tumorzellen im Vergleich zu Bakterien und anderen Mikroorganismen sehr empfindlich gegen hydrodynamische Scherkräfte sind, erscheint das Verfahren auch bei letzteren generell möglich.

Die Arbeiten wurden von der Deutschen Forschungsgemeinschaft gefördert. Ich danke Fräulein GISA MÜLLER für ihre ausgezeichnete Hilfe bei der Durchführung der Versuche.

Reproduktive Leistung weiblicher Mäuse nach Blockierung der DNS-Synthese

Reproductive Capacity of Female Mice after Inhibition of DNA Synthesis

U. H. EHLING

Institut für Biologie der Gesellschaft für Strahlenforschung, München-Neuherberg

(Z. Naturforsch. 26 b, 175 [1971]; eingegangen am 19. November 1970)

Mitomycin C (MC) blockiert in Bakterien¹ und Säugetierzellen² die DNS-Synthese durch Vernetzung der komplementären Stränge³. In spezifischen Stadien der Spermatogenese der Maus induziert MC dominante Letalmutationen⁴. Erstmals wird im folgenden gezeigt, daß MC auch die reproduktive Kapazität weiblicher Mäuse beeinträchtigt.

Weiblichen Hybriden (101 \times C3H)F₁ im Alter von 10–12 Wochen wurde intraperitoneal 5,25 mg/kg MC; 7,00 mg/kg MC oder nur das Lösungsmittel injiziert. Nach 24 Stdn. erfolgte die permanente monogame Paarung mit gleichaltrigen Hybridenmännchen. Die Nachkommen wurden nach der Geburt registriert und getötet, um die Weibchen nicht durch die Laktation zu

belasten. Alle Kontrollmäuse überlebten den 210. Versuchstag, während 80–85% der Weibchen der MC-Gruppen zwischen der 16. bis 30. Versuchswoche starben. Die Tab. 1 enthält nur die Ergebnisse bis zum 105. Tag nach der Verpaarung. In dieser Zeit konnte ein Zuchtpaar maximal 5 Würfe produzieren.

Die mittlere Zahl der Nachkommen pro Weibchen beträgt in den MC-Gruppen nur 45% bzw. 27% des Kontrollwerts. Die geringe Fertilität der behandelten Weibchen ist teilweise eine Folge der durch MC-induzierten dominanten Letalmutationen. Diese Interpretation beruht auf folgender Beobachtung: Die Versuchsdauer kann in 5 Paarungsintervalle von je 3 Wochen eingeteilt werden. Für die Kontrollen ist charakteristisch, daß die durchschnittliche Wurfgröße der beiden ersten Paarungsintervalle (9,2 \pm 0,4) größer ist, als die der beiden folgenden Paarungsintervalle (8,8 \pm 0,4). In den beiden MC-Gruppen ist die Wurfgröße im 3. und 4. Paarungsintervall (6,4 \pm 0,4 bzw. 4,4 \pm 0,6) größer, als im 1. und 2. Intervall (5,5 \pm 0,4 bzw. 3,8 \pm 0,4). Die Häufigkeit chemoinduzierter Letalmutationen bei weiblichen Mäusen ist in den ersten Tagen nach der Applikation des Mutagens am größten⁵.

Die Blockierung der DNS-Synthese durch MC führt nicht nur zur Induktion von dominanten Letalmutationen, sondern wahrscheinlich auch zur Blockierung der Entwicklung der unreifen Oozyten, wie aus der mittleren Wurfzahl der MC-Gruppen und der drastischen Abnahme der Wurfgröße vom 5. Paarungsintervall an (3,4 \pm 0,5 bzw. 2,6 \pm 0,7) abgeleitet werden kann.

Die Wirkung von MC auf die reproduktive Kapazität weiblicher Mäuse entspricht den genetischen und somatischen Effekten, die nach Bestrahlung der Keimzellen weiblicher Säuger zu beobachten sind^{6,7}.

Dosis [mg/kg]	Zahl der fertilen Weibchen	Mittlere Zahl der Nachkommen	Mittlere Wurfzahl	Mittlere Wurfgröße
0	20	40,9 \pm 2,6	4,7 \pm 0,2	8,7 \pm 0,2
5,25	19	18,6 \pm 1,9	3,2 \pm 0,3	5,8 \pm 0,3
7,00	19	11,0 \pm 1,5	2,7 \pm 0,2	4,1 \pm 0,3

Tab. 1. Mitomycin C-induzierte Abnahme der Produktivität weiblicher Mäuse.

Sonderdruckanforderungen an Dr. U. H. EHLING, Gesellschaft für Strahlenforschung m.b.H., München, Institut für Biologie, Abt. Genetik, 8042 Neuherberg, Post Oberschleißheim, Ingolstädter Landstr. 1.

¹ S. SHIBA, A. TERAWAKI, T. TAGUCHI u. J. KAWAMATA, Nature [London] **183**, 1056 [1959].

² E. REICH u. R. M. FRANKLIN, Proc. nat. Acad. Sci. USA **47**, 1212 [1961].

³ V. N. IYER u. W. SZYBALSKI, Science [Washington] **145**, 55 [1964].

⁴ U. H. EHLING, Mutation Res. **11**, 35 [1971].

⁵ W. M. GENEROSO, Genetics **61**, 461 [1969].

⁶ U. H. EHLING, Z. Naturforsch. **23 b**, 1476 [1968].

⁷ T. G. BAKER, Mutation Res. **11**, 9 [1971].