

a large ring-channel; the latter is drained by two smaller channels with a sectional area of $3 \text{ mm} \cdot 150 \mu$ which are in opposition to one another (Figure 1). On each side, the fluid then flows into a larger round channel drilled vertically and horizontally in the plate (Figure 2).

In the outer part of the two larger round channels two short PVC tubes are inserted. Their free ends are attached by a Y-shaped coupling piece, made of polyethylene, to a rubber tube 1 m in length. In this way there is a closed system from the pool to the free end of the rubber tube. Once filled, the staining pool is placed on a table and the free end of the rubber tube is inserted into a large bottle on the floor. As in a continuous suction drainage with a siphon, the fluid travels through the system of channels and tubes, depleting the pool. Fluid-flow can be easily regulated by a bracket on the rubber tube.

Handling of the staining pool. Eggs gained by flushing the tubae uterinae with Tyrode's solution are transferred with a finely drawn pipette to the pool which also contains Tyrode's solution. The latter is then replaced by

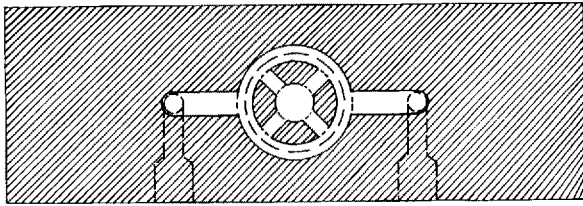


Fig. 1. Underside of the 'Perspex' plate (natural size).

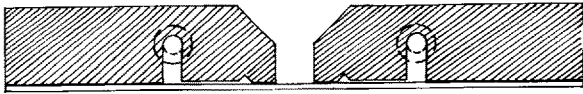


Fig. 2. Longitudinal section through the staining pool (natural size).

other solutions, according to the desired histochemical reaction. To avoid air bubbles rising from the fluid into the channel system, the solutions must be kept at room temperature, and to avoid the inflow of air the pool should never be completely depleted. The solutions must be added slowly, e.g. with a finely drawn pipette, so that the eggs retain their position on the bottom of the pool. At the end of the reaction the pool is depleted until the meniscus almost reaches the bottom of the pool. If necessary, the stained eggs are pushed with a needle into the centre of the pool. Thereafter the pool content is frozen with CO_2 ; the brackets which hold the 'Perspex' plate and the slide together are removed, plate and slide being separated by sliding one against the other. The frozen pool-content is pushed through the hole in the plate onto a slide which is covered with plastic tape. The latter has a hole in its middle in order to prevent the dispersion of the pool content upon thawing. If the freezing of the eggs is observed to be disadvantageous, the eggs are transferred directly from the pool to a slide. Finally, the fluid around the eggs is removed with a finely drawn pipette and the eggs are embedded in glycerine-gelatine¹.

Zusammenfassung. Beschreibung und Handhabung eines Färbetrichters mit basaler Abflussvorrichtung zur Durchführung histochemischer Reaktionen an Eizellen und frühen Furchungsstadien von Säugern. Der Färbetrichter ermöglicht ein mehrmaliges Wechseln der Lösungen ohne die Eier anzurühren, wodurch ein mehrmaliges Pipettieren der Eier vermieden werden kann.

P. ELMIGER

*Anatomisches Institut der Universität Basel
(Switzerland), August 14, 1965*

¹ This investigation was supported by a research grant from the Ford Foundation.

Homogenisator für kontinuierliches Homogenisieren zur präparativen Gewinnung von Zellorganellen

Im Zusammenhang mit der Isolierung der Cerebrosid-sulfatase¹, eines Enzyms, das nur in sehr geringer Konzentration in Säugerorganen enthalten ist, war es erforderlich, Homogenate von kg-Mengen Gewebe herzustellen, um eine lysosomenhaltige Partikelfraktion durch differentiell Zentrifugieren zu gewinnen. Ein Starmixgerät konnte infolge der Labilität der Lysosomen nur zur Vorzerkleinerung benützt werden. Daher wurde der gebräuchliche Potter-Elvehjem-Homogenisator² so modifiziert, dass eine kontinuierliche Passage von 10 l Gewebesuspension aus 2–4 kg Gewebe möglich wurde.

Dieser kontinuierliche Durchfluss wird durch eine Schlauchquetschpumpe erreicht, die das in einer 0,25 m Saccharoselösung vorzerkleinerte und suspendierte Material ansaugt, durch eine untere Öffnung in das feststehende Homogenisiergefäß treibt und an dem rotierenden Teflonpistill (1200 U/min) vorbeipresst bis das

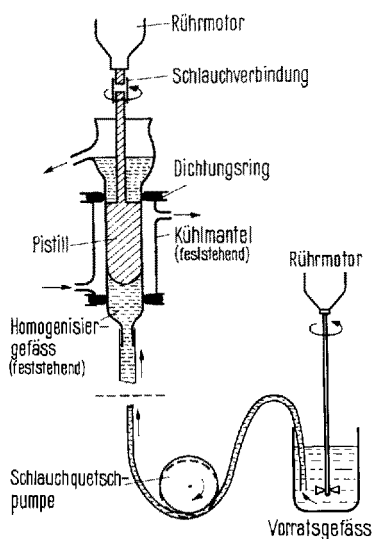
Homogenat durch eine obere Öffnung abfließt (Figur). Durch dieses Prinzip wird ein rascher Durchfluss (120 bis 150 ml/min) mit regulierbarer Geschwindigkeit gewährleistet, so dass eine lokale Überhitzung vermieden wird. Bei den bisher beschriebenen Homogenisatoren³ erfolgte die kontinuierliche Passage tropfend durch das Eigengewicht des Homogenates. Das sich während der Passage um etwa 3° erwärmende Gesamthomogenat wird in gekühlten Gefäßen aufgefangen und insgesamt 3–4 mal durch den kontinuierlichen Homogenisator geschickt. Eine Verstopfung des Spaltes zwischen Pistill und Homogenisiergefäß tritt nicht ein, wenn die schlachtfrischen Organe von zähen Anteilen befreit und im Starmix 30 sec bei 6000 U/min vorzerkleinert worden sind (400 g Gewebe und 400 ml Saccharoselösung).

¹ E. MEHL und H. JATZKEWITZ, Hoppe-Seyler's Z. 339, 260 (1964).

² V. R. POTTER und C. A. ELVEHJEM, J. biol. Chem. 114, 495 (1936).

³ K. LANG und G. SIEBERT, Biochem. Z. 322, 360 (1952). – E. S. HARRIS und J. W. MEHL, Science 120, 663 (1954).

Das Homogenat wird dann in bekannter Weise durch differentielles Zentrifugieren⁴ fraktioniert (10 min bei 800 g: Kernfraktion als Sediment, 10 min bei 25000 g:



Anordnung für kontinuierliches Homogenisieren. Der Homogenisator ist im Maßstab 1:2,4 abgebildet, die übrige Anordnung im Maßstab 1:10. Die suspendierten Gewebeteilchen werden durch eine Schlauchquetschpumpe (Typ m P2, Bühler, Tübingen) aus dem Vorratsbehälter dem Homogenisator von unten zugeführt. Bei der Homogenisierapparatur nach Potter-Elvehjem der Firma Braun, Melsungen (Rührmotor RM26, von Janke und Kunkel, 60 ml-Homogenisiergefäß mit Teflonpistill) wird das 60 ml-Homogenisiergefäß durch ein für kontinuierliches Homogenisieren modifiziertes ersetzt. Dieses Gefäß aus Pyrexglas trägt zusätzlich Oliven für Zu- und Abfluss des Homogenates und wird von 2 Gummiwülsten getragen, die in eine Metallhalterung eingespannt sind. Die Halterung kann gleichzeitig als Kühlmantel benützt werden. Die Spaltbreite zwischen Pistill und Glaswand beträgt 0,1 mm. Bei der ersten Passage wird ein konisches Pistill verwendet, das am unteren Teil eine Spaltbreite von 0,2 mm bildet. Das in einem Latexschlauch ($\varnothing$ 0,5 cm) geförderte Homogenat wird nur im Bereich der Schlauchquetschpumpe durch 2 Siliconschläuche ($\varnothing$ 0,3 cm) geführt.

lysosomenhaltige Mitochondrienfraktion als Sediment, sowie Mikrosomen und Cytoplasma als Überstand). Nach der Kernabtrennung wird die Mitochondrienfraktion durch Zentrifugieren im Durchlaufverfahren (RC-2 Kühlzentrifuge der Fa. Servall mit dem «continuous flow system» nach SZENT-GYÖRGYI und BLUM) gewonnen.

Die Leistungsfähigkeit des Homogenisators, besonders in bezug auf Schonung labiler Zellorganellen (z. B. Lysosomen), kann durch Bestimmung der sauren Phosphatase⁵ in den erhaltenen Fraktionen ermittelt werden, da diese ein charakteristisches Enzym der Lysosomen⁵ ist. In der Kernfraktion wurden 14% der Gesamtaktivität gefunden (unzerkleinerte Zellen), im Überstand 7% (zerplatzte Lysosomen?), so dass nach diesem Verfahren etwa 80% der labilen Organellen gewonnen werden können. Die beschriebene Anordnung zum kontinuierlichen schonenden Homogenisieren ist allgemein für Gewebe geeignet, die eine ähnliche Konsistenz wie Nierengewebe haben und schafft die Möglichkeit, grössere Mengen von Zellorganellen zu gewinnen, um deren Komponenten näher zu untersuchen.

Summary. Large-scale preparations of tissue homogenates are not conveniently obtained with the conventional Potter-Elvehjem homogenizer. Therefore this homogenizer was modified to permit a continuous pump-driven passage of material through the homogenizer without undue damage to particulate fractions of cells.

E. MEHL

Biochemische Abteilung der Deutschen Forschungsanstalt für Psychiatrie, Max-Planck-Institut, München (Deutschland), 9. Juni 1965.

⁴ W. C. SCHNEIDER, J. biol. Chem. 176, 259 (1948).

⁵ H. BEAUFAY, P. JACQUES, P. BAUDHUIN, O. Z. SELLINGER, J. BERTHET und C. DE DUVE, Biochem. J. 92, 184 (1964).

STUDIUM PROGRESSUS

Thalidomide Malformations and Genetic Background in the Rabbit

Introduction. The value of thalidomide as a tranquilizer and its identification as a teratogenic agent responsible for a widely publicized increase in external and internal malformations in human fetuses have posed challenging problems to both the chemist and the biologist. To the chemist, who is aware of the close relationship between thalidomide and numerous substances of everyday human use which normally are harmless, the *major question* concerns the chain of reactions by which it or its metabolites can become teratogenic. To the biologist, one perplexing question concerns the seemingly limited vulnerability to this drug displayed by those mammalian species most often used in testing teratogens, whereas the rabbit, which has rarely been used in such studies, appears to compare favorably with the human in that respect. This report

concerns (a) a preliminary study of the rabbit's response to thalidomide and (b) a test for genetic differences in vulnerability.

Materials and methods. Three strains (III, New Zealand White, 3.9 kg; M, mixed New Zealand White breeding, 3.6 kg; and OS, Dutch origin, 3.3 kg) maintained at The Jackson Laboratory are involved. A total of 25 control and 18 experimental litters were produced. The reported incidence of spontaneous deformity of III and OS is 4 and 5% respectively¹.

Thalidomide was administered orally in gelatin capsules at the rate of 500 mg/day/doe on days 6–11 post coitus (pc) (one litter was treated days 4–11). Capsules were so placed by a balling gun that swallowing was immediate with negligible trauma; hence placebos were not

¹ P. SAWIN and D. CARY, Clin. Orthopaedics 33, 71 (1964).