

the hole (j) in the housing, ensuring that the food can drop into the cage via the hole in the cage. 18 radial slots (Figure 2, k; depth: 1 mm) in the surface of the disc have a pitch corresponding with that of the chambers. By pulling gently line 1 (Figure 1) the lever (m) with the stainless steel catch (Figure 2, n) rotates the disc over an arc until a locking cantilever spring (o) snaps in the next slot. By that time the lever touches the stop (Figure 1, p). The lever returns to its resting position by means of the weight (q) leaving the dispenser ready to drop another piece of food. Shortly after feeding the fish, the magazine was turned so that the click of the returning lever was not

correlated with the moment of food dropping (training requirement; variable waiting times were used.)

We used the dispensers with pieces of food consisting of periwinkles (*Littorina* spec.) of which the opercula had been removed (after crushing of the shell and removing of the visceral mass). To fill the system the frame was lifted to the surface and unhooked from the lines. The dispensers were filled via the holes (j) by pushing the prepared pieces into the chambers by means of a chip of wood. Large airbubbles in the hose and hose connection had to be avoided. The periwinkles had to be selected on size obtain pieces that fitted fairly firmly in the chambers. Any enclosed air in the chambers after filling was released under water by turning the frame with the dispensers in an upside down position before attaching it again to the suspending lines of the cage.

The dispensers and the frame were made of perspex because it is rather transparent for underwater sounds (little scattering). An additional advantage of a clear disc is that inspection, as to whether the food pieces are set well while filling, is easy. Perspex has the disadvantage that it bends after a long submersion. To prevent the necessity of large torques the contact surface between disc and housing is minimal due to the circular rim (r); it also reduces friction by adhesion effects.

In the field, responses of the cods on the odour spreading from the food have not been noticed. Probably the system will equally well function with e.g. pieces of spleen, if suitable cut, but this was not tried. The reliability during calm weather (high surface waves may result in some pieces going lost) can be estimated from the fact that as a rule only one out of 15 pieces of food got stuck.

**Zusammenfassung.** Futtergerät für Belohnungsdressur beim Kabeljau. Der Fisch befindet sich einige Meter unter der Wasseroberfläche in einem Netzstoffkäfig. Von der Oberfläche wird aus kreisförmigem Futterbehälter jeweils ein Futterbrocken (Schneckenfuß-Stückchen) losgelöst, das in den Käfig hinunterfällt (Gehöruntersuchungen an Kabeljau in einem norwegischen Fjord).

M. A. VAN ARKEL, W. MAASSE and  
A. SCHUIJF

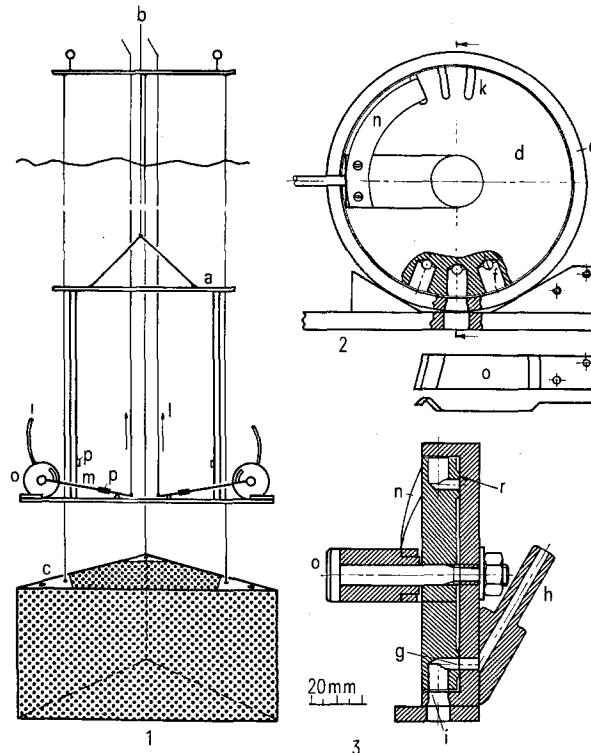


Fig. 1. Sketch of the choice-conditioning setup in the fjord showing the cage and both feeding dispensers glued on a frame.

Fig. 2 and 3. The right food dispenser. Further explanation in the text.

*Laboratory of Comparative Physiology,  
Jan van Galenstraat 40, Utrecht (The Netherlands),  
24 April 1972.*

## Zur Bestimmung der Lymphozytotoxizität

PAPPENHEIMER<sup>1</sup> stellte 1917 fest, dass tote Zellen *in vitro* mit Farbstoffen anfärbbar sind, die von lebenden Zellen nicht aufgenommen werden. GORER und GORMAN<sup>2</sup> entwickelten 1950 auf Grund dieser Beobachtung den Zytotoxizitätstest. Er beruht auf der Tatsache, dass der Farbstoff in Zellen eindringt, deren Membranen bei der Inkubation in zytotoxischen Antiseren geschädigt werden, wodurch die Zellen absterben. Der komplementerfordernde Test wird zur Bestimmung des Antikörpertiters von homologen und heterologen Antiseren, z.B. Antilymphocytenserum (ALS) verwendet<sup>3-9</sup>. Da Ausführung und Ergebnisse starken Schwankungen unterliegen, wurden zur Feststellung der Zahl toter Zellen in einer Population auch andere Methoden entwickelt, z.B. die Markierung mit <sup>51</sup>Cr<sup>10</sup> oder die Zählung mit dem Coulter-counter<sup>11</sup>. Der Farbstofftest wird aber als Vergleichsmethode und wegen

seines geringen technischen Aufwandes häufig angewandt. Eine Standardisierung erschien daher zweckmäßig.

**Material und Methoden.** Als Testzellen dienten Lymphocyten und Thymocyten<sup>12</sup>, die in TC 199 (Difco) oder Ringerlösung suspendiert wurden, die mit 1,9M HEPES (Calbiochem) gepuffert und auf pH 7,3 eingestellt war. Die Suspensionen enthielten  $10 \times 10^6$  Zellen/ml. Makrophagen, die sich im lebenden Zustand mit Trypanblau anfärben und daher die Zahlen verändern, wurden durch ein Glaswattefilter weitgehend entfernt. Der Prozentsatz lebender lymphatischer Zellen betrug 97-98%. Als Komplement wurde Meerschweinchenserum, für Thymocyten 1:10, für Lymphocyten 1:5 verdünnt, verwendet<sup>13</sup>. ALS stammte von Kaninchen, die mit Maus- oder Rattenzellen nach der Methode von LEVEY und MEDAWAR<sup>14</sup> immunisiert waren. Als Farbstoff diente Trypanblau

(BDH). Die Stammlösung (0,5% in Aq. bidest.) wurde mit 1,9M HEPES 1:50 gepuffert und auf pH 7,3 eingestellt. Vor dem Gebrauch wurde sie mit 4,5%iger NaCl-Lösung im Verhältnis 1:4 isotonisch gemacht und über Papier filtriert. Zum Test wurden verwendet: 0,2 ml Serum bzw. Serumverdünnung, 0,2 ml Zellsuspension und 0,2 ml Komplementverdünnung.

Die Kontrollen erfolgten mit Normalseren und/oder Komplement. Der Ansatz wurde 30 min bei 37°C im Wasserbad inkubiert und dann 10 min im Eisbad gelagert. Darnach wurden 0,4 ml Trypanblaulösung zugesetzt und nach 3 min der Prozentsatz blaugefärbter toter Zellen in der Zählkammer bestimmt. Ein Ansatz alle 10 min gewährleistete eine gleiche Zeitspanne für jede Untersuchung.

**Ergebnisse und Diskussion.** Bei der Inkubation veränderte sich die Grösse der Zellen nicht. Durch die Trypanblaufärbung dagegen trat teilweise eine erhebliche Zellvergrösserung auf. Das pH, das bei der ungepufferten Farbstofflösung 9,5 beträgt, spielt bei dem Test eine erhebliche Rolle. Wie die Tabelle zeigt, veränderten sich die Zellzahlen vor und nach der Inkubation mit ALS und Komplement und der Zugabe von gepuffertem Trypanblau um weniger als 5%. Nach Zusatz von ungepuffertem (pH 9,5) oder mit HEPES gepuffertem und auf pH 9,5 eingestelltem Farbstoff wurde dagegen bis zu einem Drittel der vom ALS angegriffenen Zellen aufgelöst. Der 50% Titer verschob sich dadurch bei einem Anti-Maus-Serum von 32 auf 120 bei Verwendung von Trypanblau pH 7,3 bzw. ungepuffertem Farbstoff. Durch die Pufferung ergab sich eine Änderung des UV-Spektrums des Farbstoffs. Das Extinktionsmaximum veränderte sich von 600 nm bei pH 9,5 auf 570 nm bei pH 7,3. Obwohl die pH-Reduktion auf einen physiologischen Wert als Ursache des Verschwindens der Zytolyse im Vordergrund steht, lässt der Befund an die Möglichkeit denken, dass die Farbstoffkonfiguration selbst einen Einfluss auf die Auflösung der Zellen ausüben kann.

Auch für die Zellsuspensionen spielte die Pufferung eine Rolle. Bei Verwendung einer gepufferten phys. Kochsalzlösung verringerte sich bei ALS ab einer Verdünnung 1:4 der Prozentsatz toter Zellen um 10%. Er-

Einfluss des pH vom Trypanblau auf die Zellzahlen beim Lymphocytotoxizitätstest

Vor Inkuba-	Nach Inkuba-	Nach Trypanblau gepuffert pH 7,3	Nach Trypanblau ungepuffert pH 9,5	Nach Trypanblau gepuffert pH 9,5
3,45	3,44	3,31 (-4%)		
3,65	3,49		2,41 (-34%)	
3,58	3,49			2,56 (-29,5%)

Zellen unverdünnt gezählt,  $\times 10^6/\text{ml}$ ; Durchschnittswerte von je 10 Zählungen.

betrug 89% gegenüber 99% mit der ungepufferten Suspensionslösung. Der Unterschied blieb in den weiteren Verdünnungen ungefähr gleich gross.

Die Kontrolle des Farbstofftests mit der  $^{51}\text{Cr}$ -Markierung der Zellen ergab identische Werte der Cytotoxizität, wenn zur Ausführung des Testes die beschriebenen Modifikationen verwendet wurden. Beide Verfahren wurden daher zur gegenseitigen Kontrolle angewandt.

Die Genauigkeit und Reproduzierbarkeit der Bestimmung der Lymphocytotoxizität mit dem Trypanblautest wurde untersucht. Entscheidend ist die Einhaltung eines physiologischen pH. Bei Pufferung des Farbstoffs und der Zellsuspensionen konnten die Schwankungen unter 5%<sup>15</sup> gehalten werden. Sie stimmen mit den Werten der  $^{51}\text{Cr}$ -Markierung überein. Die Ergebnisse erscheinen von Wichtigkeit auch für die Vitalitätsprüfung von Zellen mit Trypanblau.

**Summary.** The technique for testing lymphocytotoxicity by staining with Trypan-blue has been re-evaluated. It was found that both cell suspension and aqueous stock solution (0.5%) of Trypan-blue must be adjusted to a pH of 7.3 prior to mixing in order to avoid a toxic effect of the dye itself, accounting for the lysis up to 35% of the cell population. This modification permitted a reproducibility of the results with a variation of less than 5%. This Trypan-blue test gives identical results as are obtained with the  $^{51}\text{Cr}$  releasing method. The results may also be important for testing the viability of cells with Trypan-blue.

K. E. STÄDTLER, L. B. CUENI und  
G. A. SCHOENENBERGER

*Biologisch-chemische Forschungslaboratorien der Chirurgischen Universitätsklinik, Bürgerspital, Petersgraben 17, CH-4056 Basel (Schweiz),  
1. November 1972.*

- <sup>1</sup> A. M. PAPPENHEIMER, J. exp. Med. 25, 389 (1917).
- <sup>2</sup> P. A. GOREN und O'GORMAN, Transplant Bull. 3, 142 (1956).
- <sup>3</sup> G. E. KELLY, D. C. MEARS und A. G. R. SHEIL, Transplantation 12, 443 (1971).
- <sup>4</sup> P. I. TERASAKI, M. MANDELL, J. VAN DE WATER und T. S. EDINGTON, Ann. N.Y. Acad. Sci. 120, 322 (1964).
- <sup>5</sup> H. ABASA und M. WOODRUFF, Nat. Inst. Health. Inf. Exch. Group 5, Scient. Memo. (1966), p. 170.
- <sup>6</sup> S. V. JOOSTE, M. LANCE, R. H. LEVEY und P. B. MEDAWAR, Immunology 15, 697 (1968).
- <sup>7</sup> K. ONO, C. W. DEWITT, J. H. WALLACE und E. S. LINDSEY, Transplantation 7, 122 (1969).
- <sup>8</sup> W. J. MARTIN und J. F. A. P. MILLER, Int. Arch. Allergy 35, 163 (1969).
- <sup>9</sup> M. SCHLESINGER und D. HURVITZ, Transplantation 7, 132 (1969).
- <sup>10</sup> H. F. GOODMAN, Nature, Lond. 109, 269 (1961).
- <sup>11</sup> P. I. TERASAKI und N. E. RICH, J. Immunology 92, 128 (1964).
- <sup>12</sup> K. STÄDTLER und E. S. BÜCHERL, Z. ges. exp. Med. 148, 355 (1968).
- <sup>13</sup> A. R. SANDERSON, J. exp. Path. 45, 358 (1964).
- <sup>14</sup> R. H. LEVEY und P. B. MEDAWAR, Ann. N.Y. Acad. Sci. 129, 164 (1966).
- <sup>15</sup> O. J. MALM und G. J. M. SLAVIKOWSKI, Surg. Forum 12, 36 (1961).