

dehydrated in ascending series of acetone beginning with a 25% solution. This was followed by infiltration with araldite-absolute acetone mixture. The infiltration was allowed to continue overnight in a dessicator because the cover of the BEEM capsule was not completely airtight. Next morning, the araldite-acetone mixture was poured away and pure araldite was gently pipetted into the capsule. After 2 changes of pure araldite, the capsule was placed in an evacuation chamber at 50°C for 1 h after which time the chamber was gently evacuated for about 10 min. The capsule was then removed and placed in an oven at 60°C for 24 h for the resin to polymerize. Before sectioning, the blocks were removed from the capsule by making a longitudinal cut along the side of the capsule with a knife. The blocks were then cut, without any trimming, with a diamond knife on a Porter-Blum MT-2B ultramicrotome. The knife and block were aligned at a small angle so that the sections cut would be less than a complete section of the truncated tip of the pyramidal block. The small areas of dense growth can be visualized under the binoculars of the ultramicrotome and the portion to be cut can then be selected. Ultrathin sections were double-stained with uranyl acetate and lead citrate and viewed with a Hitachi HS-8 electron microscope.

Good preservation of cytological details were obtained (Figure 1) by this method. Mitochondria and other cytoplasmic organelles were well-preserved. The morphology of the nucleus and its membrane could be distinctly seen. After exposure to a cytotoxic substance⁷, the various effects on the cytoplasmic organelles and nucleus were easily studied (Figure 2). We found this method of preparing HeLa cells for electron microscopy and its application to the study of drugs and cytotoxic substances on cells in culture to be simple and reliable, and the results

are reproducible. It does not require the cells to be disaggregated either by chemical or mechanical means in order to be centrifuged down into a pellet prior to embedding in epoxy resin. One disadvantage of this method, however, is that it will be impossible to monitor the action on the drugs or chemical under test. But it has been customary for us to study the effects of the test substance by phase contrast microscopy on cells which are grown on coverslips before studying them at the ultrastructural level. This should give adequate information regarding the effects of dose and time of exposure in a particular experiment. With this information available, it would be possible to select the desired conditions of the experiment and apply them to the cells grown in BEEM capsules for electron microscopy^{8,9}.

Zusammenfassung. Angabe einer einfachen Methode zur Untersuchung von cytotoxischen Substanzen an HeLa Zellen und Möglichkeit, HeLa Zellen zu kultivieren.

C. K. TAN, H. L. CHAN and C. H. TAN

*Departments of Anatomy and Biochemistry
University of Singapore, Sepoy Lines,
Singapore 3, 12 September 1974*

⁶ A. J. DALTON, *Anat. Rec.* 127, 281 (1955).

⁷ C. H. TAN, C. K. TAN and Y. F. TEH, *Experientia* 29, 1373 (1973).

⁸ M. L. WATSON, *J. biophys. biochem. Cytol.* 4, 475 (1958).

⁹ E. S. REYNOLDS, *J. Cell Biol.* 17, 208 (1963).

Zeitsparende automatische Mitostatikazufuhr bei der Leukozytenkultur zur Chromosomendarstellung

Timesaving Automatic Supply of Mitostatica to Leucocyte Cultures for Chromosome Preparation

In zunehmendem Maße werden zytogenetische Untersuchungen routinemässig bei Mensch und Tier durchgeführt. Nach erfolgter Kultur über 48 bis 72 h muss dem Kulturansatz ein Mitostatikum wie z.B. Colcemid zur Arretierung der Zellteilung in der Metaphase zugeführt werden. Die Colcemideinwirkungszeit beträgt 2 bis 4 h; anschliessend kann mit der Aufarbeitung der Kultur begonnen werden. Zumeist erfolgt der Zusatz von Colcemid zu Arbeitsbeginn am Morgen, und es muss dann die entsprechende Zeit abgewartet werden, um mit der Aufarbeitung beginnen zu können. Diese dauert dann erfahrungsgemäss über den Mittag hinaus. Nach der ersten Fixierung kann aber erst der Arbeitsprozess unterbrochen werden und die Präparate können im Kühlschrank aufbewahrt werden. Um den Nachteil der verzögerten Aufarbeitung zu beheben, haben wir ein kleines und einfaches Gerät gebaut, das die Colcemid-zufuhr automatisch in die frühen Morgenstunden zu verlegen erlaubt. Damit kann die Aufarbeitung zeitgerecht begonnen werden und der Arbeitsprozess bis zur Herstellung der Objektträgerpräparate am Vormittag abgeschlossen werden. Dies führt zu einer wesentlichen Vereinfachung des Laborablaufes.

Gerätebeschreibung. Um das Gerät in einem Brutschrank unterbringen zu können, wurde eine möglichst platz-

sparende Rundform gewählt (Figur 1). Da eine Person in einem Arbeitsgang nicht mehr als 8 bis 10 Kulturen gleichzeitig aufarbeiten kann, wurde das Fassungsvermögen auf 12 Kulturen beschränkt; damit können

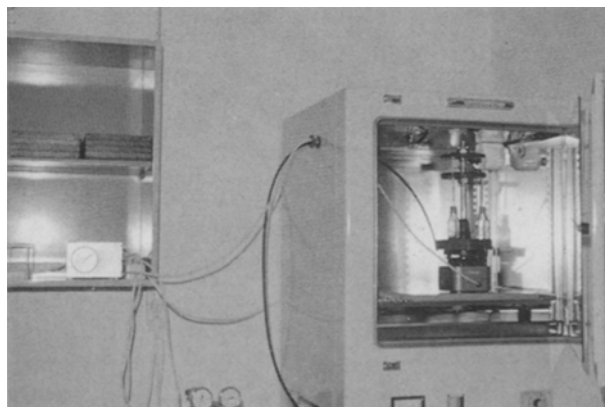


Fig. 1. Photographische Aufnahme des Kultursystems mit dem automatischen Pipettiergerät.

maximal von 6 Kulturen je zwei Doppelansätze gleichzeitig mit Colcemid versehen, bzw. 12 Einzelansätze verarbeitet werden. Es ist aber durchaus möglich, ein grösseres Gerät zu bauen. In Figur 2 wird das Gerät schematisch dargestellt. Es besteht aus einem Zugmagneten (1) 220 V, 50 Hz, 3,8 kp Dauerbelastung, 42 mm Hub, einer Grundscheibe (2) aus Sustamid zur Aufnahme der Kulturflaschen (6), einer Druckfeder (3), einer Einhängescheibe (4), für die Einwegspritzen (7) und einer Druckscheibe (5), beide Scheiben ebenfalls aus Sustamidmaterial.

Der Zugmagnet steht in Verbindung mit einer elektrischen Zeitschaltuhr (8), die ausserhalb des Brutschrankes (9) steht und die Vorwahl des gewünschten Zeitpunktes der Einspritzung des Mitostatikums gewährleistet.

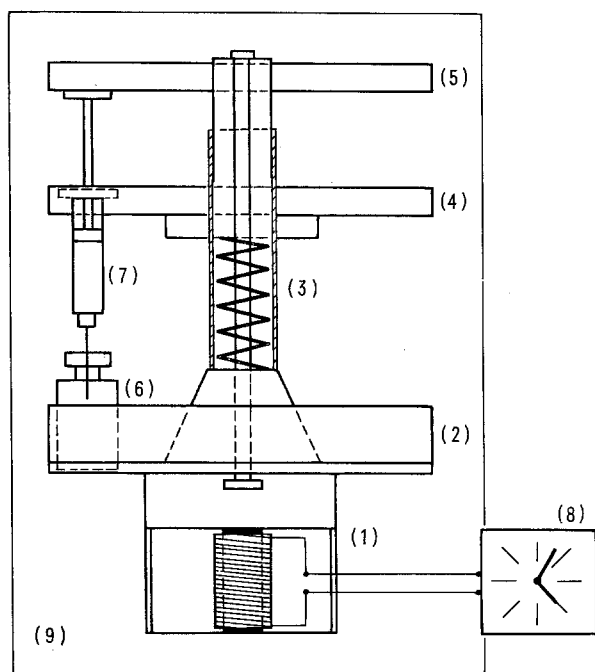


Fig. 2. Schematische Darstellung des automatischen Pipettiergerätes.

Die Zeitschaltuhr kann 24 h vorher eingestellt werden und schaltet das Pipettiergerät in einem 15 min Intervall ein und aus. Während der 15 min Schaltzeit fibriert der Zugmagnet und gewährleistet somit eine Durchmischung des Mitostatikums mit der Medienmenge.

Einstellung des Gerätes. Eine den Kulturflaschen entsprechende Anzahl an 1 ml Einwegspritzen wird mit der nötigen Menge Colcemid (zumeist 0.3 ml einer 10 µg/ml Colcemidlösung) versehen, die Nadel mit der Spritze in die Kulturflasche (besitzt als Verschluss einen Gummistopfen) eingestochen, die Nadel bis zum Anschlag vorgeschoben, die Spritze in die Einhängescheibe eingehängt und der Spritzenkolben bis zur Druckscheibe zum Anschlag aufgezogen. Damit entsteht ein Luftpolster zwischen Kanülenansatz und Mitostatikaflüssigkeit, wodurch ein Austropfen verhindert wird.

Zum eingestellten Zeitpunkt schaltet die Zeitschaltuhr den Zugmagnet ein, dieser zieht die Druckscheibe an und drückt somit die aufgesogene Menge Colcemid mit Druck in die Kulturflasche. Der Druck reicht für die leichte Aufwirbelung der Zelloberfläche aus, womit die Zellen in innigen Kontakt mit dem Mitostatikum gelangen. Druck und Hubweg können eingestellt werden. In Serienversuchen konnte die einwandfreie Wirksamkeit des Colcemids nach einer Verweildauer von 24 h im Pipettiergerät ermittelt werden.

Summary. An instrument for the automated and time-variable supply of mitostatica to leucocyte cultures for chromosome preparations is described. This instrument allows a routine laboratory to prepare cultures with a better time schedule. The action of colcemid was successfully tested after a 24-h period in the incubator before adding to the culture.

G. STRANZINGER und A. KUCHLER¹

Institut für Tierzucht der Technischen Universität München, D-805 Freising-Weihenstephan (Bundesrepublik Deutschland, BRD), 18. September 1974.

¹ Der Hersteller des Gerätes ist: Elektromeister Alfred Kuchler, D-8399 Prienbach 153, Bundesrepublik Deutschland.

Measurement of Fibrinolysis in Rat System by One-Dimensional Diffusion Method

The most commonly used method of estimating fibrinolytic activity is based on the external lysis of pre-formed fibrin plate¹. Most recently a one-dimensional diffusion method using small fibrin tubes was developed by YASUKOUCHI and WATANABE², and in the human system it has been proved to be more advantageous than the conventional fibrin plate technique. Methods measuring fibrinolytic activity in human system cannot be applied to rat, a species convenient for studying fibrinolysis, without modification³. In the present experiments the applicability of the above-mentioned method to rat system was established and the optimal conditions were determined.

Materials and methods. Blood was obtained from the inferior vena cava of Wistar male rats by a plastic

syringe in deep pentobarbital anaesthesia. Euglobulin (Eug) fraction was prepared from the pooled plasma of 12 animals according to GALLIMORE et al.³. The precipitated Eug was redissolved in 1/10 volume of 0.12 M pH 7.4 sodium acetate solution (10 × Eug) and then diluted as indicated in the Table and the Figures.

¹ T. ASTRUP and S. MÜLLERTZ, Arch. Biochem. Biophys. 40, 346 (1952).

² T. YASUKOUCHI and T. WATANABE, Thromb. Diath. haemorrh. 28, 329 (1972).

³ M. J. GALLIMORE, H. M. TYLER and J. T. B. SHAW, Thromb. Diath. haemorrh. 26, 297 (1971).