

6. On November 15th 1974, a new cycle of solar activity started with a high latitude sunspot. Also a sudden rise in the average monthly BSR percentage was observed since November 1974 (20% against 9% in October 1974), which continued during 1975 (in April 30%). This indicates a sudden drastic change in the physico-chemical state of the blood of healthy population groups in Leiden at the end of 1974.

Physiological changes at Oslo. 1. The BSR values changed rather suddenly during 1974. They became much lower (i.e., BSR percentages 1–2 mm much higher). The yearly averages of percentages of donors with BSR 1–2 mm/1st h fluctuated from 1966 to 1973 between 25 and 33%. In 1971, 1972 and 1973 these values were about 30, 32 and 31%, whereas in 1974 it suddenly increased to 41%, a value never before observed since the beginning of the observations in 1966. This could be due to the fact that the number of sunshine hours (i.e., infrared radiation) in Oslo at the end of the year was the lowest since 1953. It has not been possible to establish whether the total UV and X-ray radiation at Oslo was considerably higher than

in other years, which could also have had a reducing effect on BSR values in Oslo.

2. The haemoglobin (Hb) values increased in 1974, as happened at Leiden. The number of male donors with relatively high Hb (15.0–16.9) increased from 66.6% (in 1973) to 69.6% (in 1974). The increase was even more in the Hb group 15.8–17.5%.

3. Unfortunately no blood pressure data are available in Oslo, so no comparison could be made between 1973 and 1974.

These various observations in Leiden and Oslo support the assumption that the meteorologically abnormal year 1974 had a considerable effect on a number of objectively measurable basic physiological functions in man. Undoubtedly many other, not continuously recorded, physiological parameters in the population in The Netherlands and Norway must have been affected by these weather conditions, and this may be true also for other parts in the world which experienced abnormal meteorological conditions during 1974.

PRO EXPERIMENTIS

Vereinfachte Chromosomenbänderungsmethode bei landwirtschaftlichen Nutztieren

Simple Chromosome Banding Technique for Farm Animal Investigations

G. STRANZINGER

Institut für Tierzucht an der Technischen Universität München, D-805 Freising-Weihenstephan (Bundesrepublik Deutschland, BRD), 16. Juli 1975.

Summary. For routine cytogenetic investigations, a simple banding technique on chromosomes is described. Used on different cell material, a visible banding appearance is produced which makes the typing of chromosomes precise and fast. On 2 examples of cattle and rabbit chromosomes, the identification of a centric fusion and a trisomic is shown.

Obwohl seit dem Erscheinen der ersten Veröffentlichung über die Fluoreszenzmethode von CASPERSSON et al.¹ eine Flut von Arbeiten über dieses Thema erschienen sind, soll hier dennoch nochmals eine Methode beschrieben werden, die sich in den Händen des Verfassers seit über drei Jahren bewährt hat und von den verschiedensten Veröffentlichungen (M. SEABRIGHT², DRETS und SHAW³, SCHNEDEL⁴) die günstigsten Bedingungen zu eigen machte. Die Bänderungsmethoden werden nach den ersten euphorischen Anfängen nunmehr realistisch in die zytogenetischen Untersuchungen eingebaut und haben ihren Platz innerhalb der Zytogenetik gefunden. (SELLES et al.⁵; STRANZINGER und FÖRSTER⁶). Es soll hier aber nicht verschwiegen werden, dass eine direkte Übernahme dieser Methode in einzelnen Labors häufig deshalb nicht gelingt, weil meist sehr unscheinbare aber wichtige Einzelheiten nicht beachtet werden. In dieser Arbeit sollen deshalb für routinierte Zytogenetiker unwichtige Details besprochen werden, um eine Anwendung für neue Interessenten zu erleichtern.

Material und Methoden. Die Kultur und Aufarbeitung der Zellen oder Gewebepreparate bis zum Objektträger erfolgt nach den üblichen Methoden. Als hypotone Lösung setzt sich überall die 0,075 M KCl-Lösung durch. Damit wird auch eine weitgehende Standardisierung der Behandlung möglich, da die Zeiteinwirkung ebenfalls nur geringe Abweichungen erlaubt, ca. 7 Min. Einwirkungszeit und 7 Min. Zentrifugationszeit sind als optimal anzusehen. Kleinere Variationen sind möglich und manch-

mal auch nötig, da das Zellmaterial und das Alter der KCl-Lösung, die Temperatur der Lösung (37°C) und die Temperatur im Labor sich in der Wirkung gegenseitig beeinflussen. Von entscheidender Bedeutung ist die Anfertigung von Tropfpräparaten. In unserem Labor hat sich folgende Methode sehr bewährt, da sie ebenfalls leicht zu standardisieren ist: Nur trockene, saubere und exakt vorgereinigte Objektträger werden für die Präparation verwendet. Nach der 3. Fixierung mit 3 Teilen Methanol und 1 Teil Eisessig (tiefgekühlt im Gefrierfach bei –20°C) wird die optimale Zellkonzentration eingestellt. Drei Tropfen Zellflüssigkeit werden aus ca. 10 cm Höhe (in kleinerem Abstand) auf den trockenen Objektträger aufgetropft. Sofort anschliessend wird einmal leicht im rechten Winkel auf den Objektträger geblasen, die überstehende Flüssigkeit einmal längs und einmal an der schmalen oberen Seite des Objektträgers auf ein Filterpapier abgetropft.

¹ T. CASPERSSON, L. ZECH and C. I. JOHANSSON, *Expl Cell. Res.* 60, 315 (1970).

² M. SEABRIGHT, *Chromosoma* 36, 204 (1972).

³ M. E. DRETS and M. W. SHAW, *Proc. natn. Acad. Sci., USA* 68, 2073 (1971).

⁴ W. SCHNEDEL, *Chromosoma* 38, 319 (1972).

⁵ W. D. SELLES, K. M. MARIMUTHU und P. W. NEURATH, *Human-genetik* 22, 1 (1974).

⁶ G. STRANZINGER und M. FÖRSTER, *Experientia* 32, 24 (1976).

Sofort anschliessend wird der Objektträger im Abstand von 20 cm unter einem Haarfön (22 V, 300 W) mit Warmluftgebläse (bei 20 cm Abstand 40°C, Temp. max. 52°C) gehalten. Man hält den Objektträger so lange unter die Warmluft, bis das Antrocknen beobachtet werden kann. Zur Überprüfung der richtigen Zellkonzentration und Qualität des Präparates soll der Objektträger nun unter Phasenkontrast betrachtet werden. Es kann auch sofort angefärbt (nicht für die Bänderung) werden. Um möglichst wenig Pufferlösung für die Färbung im Labor zu verwenden, hat sich der Boraxpuffer sehr bewährt. In 20 Teilen Pufferlösung (pH 9,0) und einem Teil Giemsalösung (Merck, Kat.- Nr. Art. 9204) werden die

Objektträger in 4 Min. gefärbt. Zum Teil ist nach dieser Färbemethode schon eine leichte Bänderung der Chromosomen zu erkennen. Sind in 4 Min. die Objekte nicht ausreichend angefärbt, ist entweder die Giemsalösung zu alt oder es stimmt die Pufferlösung nicht. Vor einer Überfärbung ist abzuraten, da dann keine chromosomalen Einzelheiten zu erkennen sind. Für die eigentliche Bandfärbung sind die frisch bereiteten Objektträger nicht geeignet, da Zellen durch die Behandlung zu leicht zerstört werden. 24 h in Zimmertemperatur reichen aus, um am nächsten Tag die Bandfärbung durchführen zu können. Objekte älter als 14 Tage können mit dieser Methode kaum gebändert werden bzw. die Bänderungs-

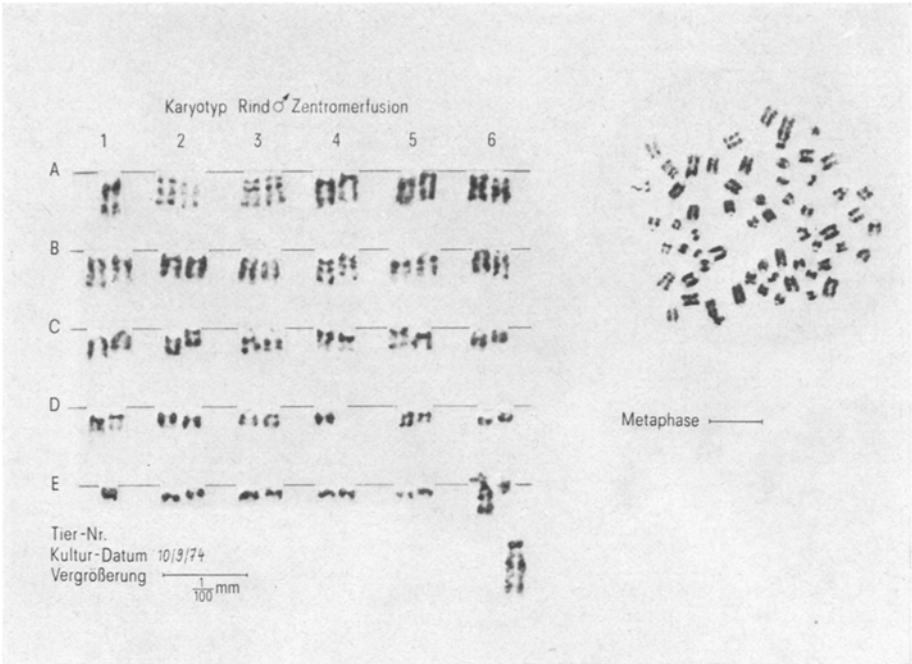


Fig. 1. Bandkaryotyp einer Zentromerfusion beim Rind (♂).

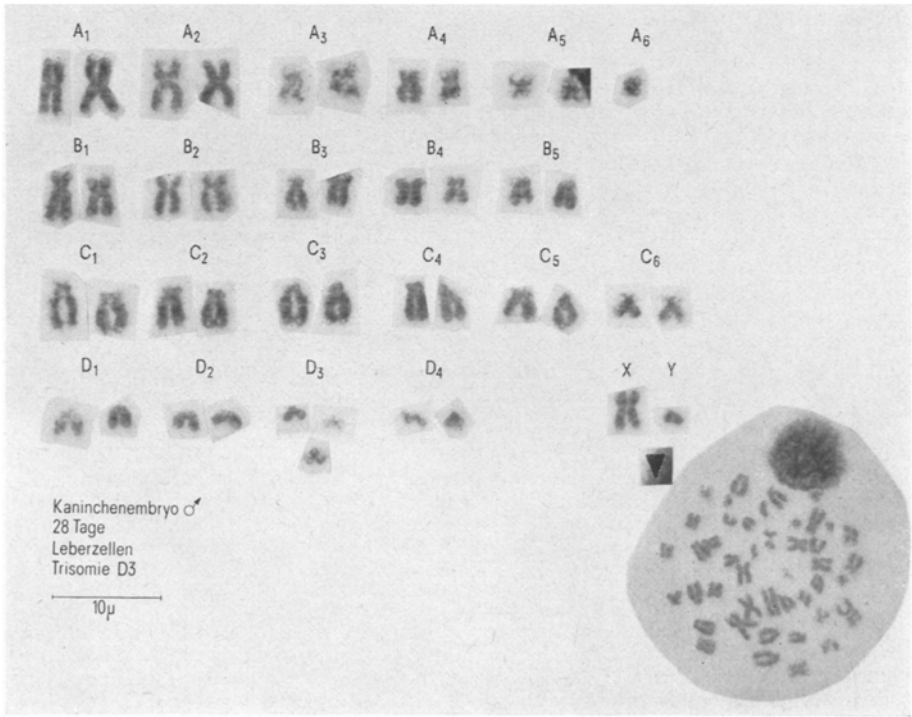


Fig. 2. Bandkaryotyp einer autosomalen Trisomie beim Kaninchen (♂).

frequenz wird reduziert (STRANZINGER⁷). Die Objektträger sollen flach auf einen Färberost gelegt und mit dest. Wasser überschichtet werden. Sofort anschliessend werden mit einer 0,025%igen Trypsinlösung (37°C) im pH 7,0 die Objektträger vorsichtig überschichtet und nach 20 Sek. (Wahlweise bis zu 2 Min. zu behandeln) wiederum mit dest. H₂O abgespült.

Die Wahl des Trypsins ist von ausschlaggebender Bedeutung. Wir konnten z.B. mit dem Trypsin der Fa. Merck (Kat.-Nr. Art. 9204) keine Bänderung erzielen und verwenden ausschliesslich das 0,25%ige Trypsin von Gibco, Kat.-Nr. 505, welches wir nach erstmaligem Auftauen in kleinen 10 ml Portionen nochmals einfrieren. Kurz vor dem Färbevorgang wird die entsprechend benötigte Menge Trypsin aufgetaut und aufgelöst und mit auf 37°C vorgewärmtem Sörensen-Puffer 1:10 verdünnt. Die Verdünnung nimmt eine gelbe Farbe (sauer) an und wird mit 10%iger Bikarbonatlösung auf Färbeumschlag (von gelb auf rot) titriert. Trypsin (1:250) der Firma DIFCO (Art.-Nr. 0152-13) wird in Pulverform geliefert. Verdünnt mit (Mg⁺² und Ca⁺² frei) Pucks BSS-Lösung bringt dieses Trypsin ebenfalls gute Bänderung (WANG et al.⁸). Die notwendige Auflösung des Trypsins ist jedoch ein zusätzlicher Aufwand gegenüber der bereits gebrauchsfertigen Gibco-Trypsinlösung. Nachdem das Trypsin, nach 20 Sek. bis 2 Min. Einwirkungszeit, mit dest. H₂O abgespült wurde, wird eine auf 60°C vorgewärmte Giemsa-Borax-Puffer-Lösung auf die Objektträger gegeben und nach 2 Min. eine neue in Zimmertemperatur aufbewahrte Giemsa-Borax-Puffer-Lösung überschichtet. Nach weiteren 2 Min. können die Objektträger mit Leitungswasser abgespült, getrocknet und unter dem Mikroskop betrachtet werden. Sollte die Bänderung zu schwach, d.h. die Chromosomen

noch durchgehend normal angefärbt sein, so kann der Farbstoff mit Fixierlösung entfernt, die Objektträger mit dest. H₂O abgespült und die Trypsinbehandlung mit zeitlichen Modifikationen wiederholt werden. Es kann ausserdem empfohlen werden, dass besonders gute Metaphasen (kreisförmige Lage der Chromosomen ohne Überlagerungen und Berührungen und in der Prometaphase) in den Koordinaten registriert und nach jeder Neubehandlung verglichen werden.

Metaphasen auf einem Objektträger sind sehr unterschiedlich stark gebändert und man kann mit nur 10% der auf dem Objektträger befindlichen Metaphasen für eine Aufnahme rechnen. Die Darstellung einiger Bandkaryotypen bei Rind und Kaninchen soll die Differenzierungsmöglichkeiten spezieller Chromosomenanomalien aufzeigen.

Zusammensetzung des Borax-Puffers.

Stammlösung A: Borsäure H₃BO₃ MG 61,83, 0,2 M = 12,3 g/l 50 Teile
Stammlösung B: Natriumborat NaBO₂ · 4 H₂O, MG 137,86 0,2 M = 27,57 g/l 59 Teile
mit dest. H₂O auffüllen auf 200 Teile.

Zusammensetzung des Sörensen-Puffers.

Sörensen-Puffer (nach SCHNEDL für Bandfärbung M/15 KH₂PO₄/Na₂HPO₄ mit einem pH von 6,8).
KH₂PO₄ MG = 136,09 – 1/15 M = 20,41 g/l
Na₂HPO₄ · 2 H₂O MG = 177,99 – 1/15 M = 26,69 g/l.
Der Gehalt an Methylen Violet Bernthsen in Giemsalösung ist von Bedeutung und kann durch leichtes Aufkochen aktiviert werden.

⁷ G. STRANZINGER, Mammalian Chromos. Newslett., in press.

⁸ H. C. WANG und F. C. DICKINSON, Cytobios 6, 47 (1972).

Construction of a PO₂ Microelectrode for Use in Small Blood Vessels

F. W. MAES¹⁰

Zoological Laboratory, Groningen State University, Kerklaan 30, Haren 8100 (The Netherlands), 7 July 1975.

Summary. The construction of a Clark-type PO₂ electrode is described. The electrode has a tip diameter of less than 0.4 mm and a 95% response time of about 2 sec.

For investigations on oxygen transport in fish, a PO₂ transducer was desired that was small and sturdy enough for use in blood vessels (tip diameter less than 0.5 mm), and fast enough to monitor blood PO₂ changes (95% response time at most 2 sec). The membrane-covered polarographic (Clark type) PO₂ electrode is widely used for in vivo measurements of oxygen tension, and many such electrodes have been described in the literature. Some of them, having very small tips (less than 10 µm)^{1,2}, were considered to be too fragile. Others have tip diameters over 0.8 mm³⁻⁵, or are too slow⁶. This paper describes the construction of an electrode that meets the requirements mentioned above.

Construction of the electrode. Basically the electrode consists of a platinum wire (the cathode) sealed in glass. The glass is coated with silver paint which results in a silver ring at the tip (the anode). The tip is covered by an electrolyte-absorbing medium over which an oxygen-permeable membrane is fitted.

Platinum wire is coated with glass by a modification of the method described by BALLINTJN⁷ (Figure 1, a, b and c). Then, electrical connections to the electrode are made with varnish-insulated copper wire (Figure 1, d). Contact with the cathode (upper knot) is established by silver paint (DAG S56 colloid silver in solvent, Acheson Col-

loid B. V., Scheemda, The Netherlands). Also, a layer of silver paint (the future anode) is applied from the lower knot down to the tip of the electrode (Figure 1, e). After allowing the paint to dry, the entire electrode is insulated by dipping it into chloroform-diluted epoxy resin (resin AW 106, hardener 953U, CIBA AG, Basel, Switzerland). The resin is baked for half-an-hour at 80°C. 3 to 5 of such layers are applied. A piece of glass tube fitting around the knots is fixed to the electrode, using undiluted epoxy resin (Figure 1, f). This protects the connections and facilitates handling of the electrode.

The tip of the electrode, which has become covered with paint and resin, is ground to a slightly convex shape on a

¹ H. I. BICHER and M. H. KNISELY, J. appl. Physiol. 28, 387 (1970).

² I. A. SILVER, Med. Electron. biol. Engng. 3, 377 (1965).

³ R. F. HUXTABLE and I. FATT, J. appl. Physiol. 37, 435 (1974).

⁴ H. P. KIMMICH and F. KREUZER, in *Progress in Respiration Research* (Ed. F. KREUZER; S. Karger, Basel, New York 1969), vol. 3, p. 100.

⁵ D. PARKER, A. KEY, R. DAVIES, J. W. SCOPES and H. MARCOVITCH, Bio-med. Engng. 6, 313 (1971).

⁶ H. I. BICHER, J. W. RUBIN and R. J. ADAMS, in *Advances in Experimental Medicine and Biology* (Eds. H. I. BICHER and D. F. BRULEY; Plenum Press, New York, London 1973), vol. 37A, p. 107.

⁷ C. M. BALLINTJN, Experientia 17, 523 (1961).