

Eine Einrichtung zur schnellen Serienpräparation von Gewebestückchen

TH. BUTTERFASS

Max-Planck-Institut für Pflanzenogenetik, Ladenburg am Neckar, Rosenhof

A device for fast serial preparation of small pieces of tissue

Summary. A device is described for the joint transfer of numerous separate pieces of tissue (e. g., root tips or young leaves) from one fluid to another, to be used in pretreatment, fixation, maceration, rinsing etc. Certain features of this device render it more useful than similar constructions recommended by other authors. It has been evaluated for several years in chromosome counts of sugar beets, and it may prove useful for various other purposes.

In einer früheren Arbeit (BUTTERFASS 1964) wurde eine Vorrichtung erwähnt, die es erlaubt, eine größere Anzahl beliebig kleiner Herzblättchen oder anderer Gewebestückchen gleichzeitig, aber getrennt, von einer Flüssigkeit in die nächste zu überführen, wenn z. B. die Chromosomenzahl vieler numerierter Zuckerrübenpflanzen bei kleinstem Aufwand bestimmt werden soll. Anregungen von Fachkollegen folgend wird hier die Beschaffenheit und die Herstellung dieses Hilfsmittels so weit wie möglich beschrieben. Weitere Einzelheiten müssen ausprobiert werden.

Das Prinzip ist das gleiche wie bei früher beschriebenen Einrichtungen (MELNYK 1961, WALTHER 1961): Zahlreiche einzelne Fächer mit durchlöcherten Böden sind miteinander verbunden; der ganze Block wird aus einer Flüssigkeit in die nächste transportiert. Die von MELNYK beschriebene Einrichtung läßt sich, da sie ziemlich flach und breit gebaut ist, nur für eine relativ kleine Anzahl von Präparaten verwenden; außerdem ist der Rahmesteil in Europa schwer zu beschaffen. Die von WALTHER angegebenen Blöcke sind auf Bestellung lieferbar, besitzen aber einige Nachteile. Erstens wird ein fester Boden verwendet, in den Löcher gebohrt werden; da diese nicht beliebig klein sein können, fallen kleinere Wurzelspitzen usw. leicht durch. Zweitens wird die Unterteilung des Blocks durch kreuzweises Ineinanderkitten von Trennwänden erreicht, wobei auf Grund kleiner Ungenauigkeiten beim Zusammenpassen Lücken bleiben, durch die kleine Teilchen aus einer Zelle in die nächste gelangen können. Drittens ist die angebotene Einrichtung so niedrig, daß der Inhalt schon bei leichtem Verkanten ausfließen kann. Viertens ist der Boden undurchsichtig. Diese Nachteile lassen sich beseitigen, freilich zum Teil auf Kosten der Robustheit.

Mehrere Meter lange Stücke von flexiblem PVC-Schlauch von z. B. 13 mm Außendurchmesser werden

längere Zeit im nicht gerollten Zustand aufbewahrt, damit die Krümmung verschwindet. Ferner braucht man glasklare PVC-Folie, am besten Astralon karto-graphisch M 50, 0,15 mm dick, beiderseits poliert, der Firma Dynamit Nobel A.G. in Troisdorf¹. Der Schlauch wird in einer von einem Schreiner leicht aus Holz anzufertigenden einfachen Schneidlade gegen einen Anschlag rechtwinklig in gleich lange Stücke geschnitten, am besten mit Hilfe eines Messers mit dünner Klinge und Sägeschliff, einem sog. Tomatenmesser. Der Schlauch darf sich während des Schneidens nicht verschieben. Das richtige Schneiden erfordert etwas Übung. Wenn Blöcke mit 50 Zellen herzustellen sind, sollten die Schlauchstücke nicht kürzer als 4 cm sein. Kleinere Blöcke kann man niedriger wählen. Die Folie wird in quadratische Stücke von etwa 15×15 mm geschnitten.

Die Schlauchstücke verschließt man einseitig durch Aufschweißen von Folienstücken. Dazu wird ein kleiner Lötkolben (z. B. von 80 W) über einen Widerstand (etwa eine Glühbirne von geeigneter Stärke) aufgeheizt. Der Lötkolben trägt ein rundes Metallrohr, das den gleichen Durchmesser und etwa die gleiche Wandstärke wie der Schlauch und ein glattes Ende besitzt (Abb. 1). Er wird an einem beschwer-ten Laborstativ so befestigt, daß die Öffnung des Rohrs senkrecht nach unten zeigt. Durch Anpressen eines mit einem Folienstück belegten Schlauchstücks von unten her an das heiße Rohr werden Folie und Schlauchstück *fest* miteinander verbunden. Das erreicht man nur mit genügend hoher Temperatur. Andererseits darf das Rohr auch nicht zu heiß werden, weil die Folie sonst an ihm hängenbleibt. Um ein gleichmäßiges Festhaften der Folie an dem Schlauch zu erreichen, wird dieser nach dem ersten Anpressen etwas gedreht und ein zweites Mal gegen das Rohr gedrückt.

Nachdem die gewünschte Anzahl von einseitig verschlossenen Schlauchstücken hergestellt ist, werden die überstehenden Folienteile abgeschnitten. Die einseitig verschlossenen Schlauchstücke werden nun seitlich so miteinander verschweißt, daß Blöcke aus z. B. 4×5 oder 5×10 Einzelzellen entstehen. Dazu wechselt man den Fuß des Lötkolbens gegen einen Fuß aus, der ein 1–1,5 mm dickes Blechstück trägt. Dieses muß mindestens $\frac{2}{3}$ so breit sein wie die Schlauchstücke lang sind (Abb. 1) und mag etwa 3–4 cm lang sein. Es wird in der Regel ohne vorgesetzten Widerstand aufgeheizt werden können. Der Lötkolben wird nun so festgeklemmt, daß das Blechstück senkrecht zum Tisch steht und eine

¹ Dr. Hardnak GRAF VON DER SCHULENBURG hat den Verf. freundlicherweise auf diese Folie aufmerksam gemacht. Sie besitzt den Vorteil, in kleinsten Mengen lieferbar zu sein. Sie eignet sich übrigens auch als billiger Deckglasersatz, und zwar, wegen der flachen Form (Platten, ungerollt) und der beiderseitigen Polierung, besser als alle uns bisher bekannten anderen Folien.

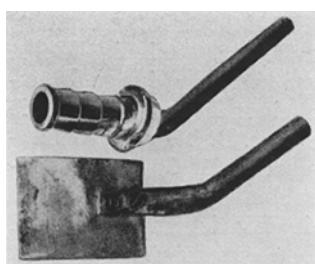


Abb. 1. Das Metallrohr und das Blechstück, die nacheinander als Enden eines Lötkolbens verwendet werden.

Verkanten ausfließen kann. Viertens ist der Boden undurchsichtig. Diese Nachteile lassen sich beseitigen, freilich zum Teil auf Kosten der Robustheit.

Mehrere Meter lange Stücke von flexiblem PVC-Schlauch von z. B. 13 mm Außendurchmesser werden



Abb. 2. Blöcke von zweierlei Größe mit passenden Gefäßen. Die Unterseiten der Blöcke zeigen nach oben, damit die durchlöcherten Böden sichtbar sind.

seiner Seitenkanten einige Millimeter über der Tischfläche verläuft; die Vorderkante ist dann dem Beschauer zugewandt. Man nimmt nun zwei Schlauchstücke, die geschlossenen Enden *nach unten*, und schiebt sie, eine von rechts und eine von links, auf der Tischplatte an das Blech des Lötkolbens heran, an dem man sie für kurze Zeit (z. B. etwa eine Sekunde lang) unter leichtem Druck beläßt. Dann zieht man beide Stücke möglichst gleichmäßig gemeinsam zu sich her und vereinigt sie unmittelbar nach dem Vorbeigleiten an der Platte durch stärkeren Druck, den man noch einige Sekunden lang weiter ausübt. Dann nimmt man die erhaltene Zweier-einheit in die eine und ein weiteres Schlauchstück in die andere Hand und setzt das Zusammenschweißen linear fort, bis eine Reihe von gewünschter Länge (z. B. aus 5 oder aus 10 Zellen) entstanden ist. Das Blech muß öfter abgekratzt werden.

Sind auf diese Weise alle Schlauchstücke zu einreihigen Verbänden verschweißt, werden die Verbände zu Blöcken vereinigt. Das geschieht mit dem gleichen Blechstück, indem man zwei Zellenreihen zunächst so nebeneinander stellt, wie sie zusammengefügt werden sollen, und mit der Hand in ihrer gegenseitigen Lage fixiert. An einem Ende spreizt man sie dann etwas auseinander, schiebt sie auf der Tischplatte gegen das heiße Blechstück, die eine Reihe von links und die andere von rechts, drückt zusammen und zieht dann wie oben beschrieben unter Druck zurück. Dann dreht man um 180°, so daß das andere Ende der Reihen dem Lötkolben zugewandt ist, und bringt das Schweißblech so weit zwischen die stärker auseinandergespreizten Zellenreihen, daß das zweite, dann das dritte usw. bis zum letzten Zellenpaar miteinander verschweißt werden können. Mit der erhaltenen Doppelreihe und einer neuen Einzelreihe verfährt man jetzt sinngemäß ebenso. Da sich eine Doppelreihe nur noch geringfügig nach der Seite verbiegen läßt, wird nur die neu hinzukommende Reihe abgespreizt. Es ist deshalb darauf zu achten, daß das Blech so flach am Lötkolben ansitzt, daß seine Befestigung, die viel heißer wird als das Blech selbst, vom PVC genügend ferngehalten werden kann. Beim seitlichen Verschweißen macht es übrigens weniger aus, wenn die Temperatur zu hoch ist, als beim Aufschweißen der Folienstücke; höchstens bildet sich etwas Kohle. Wegen der beißenden Dämpfe arbeitet man unter einem Abzug oder in einem gut gelüfteten Raum.

Wenn die Blöcke ihrer Form nach fertig sind, werden die Böden *von innen her* mit Hilfe einer Präparier-nadel durchlöchert. Die Löcher (Abb. 2) können fast beliebig klein gewählt werden.

Die Gefahr, daß beim Umsetzen eines Blocks mit kleinen Löchern viel Flüssigkeit im Innern zurückbleibt, wird vermieden, wenn man den Einsatz sehr langsam aus der Flüssigkeit heraushebt (einige Sekunden Zeit nehmen!) und dadurch die Kohäsion der Flüssigkeit zum Entleeren ausnützt. Umgesetzt wird mit einer kräftigen Pinzette. Den herausgenommenen Block stellt man kurz auf ein Stück Filterpapier, drückt ihn, wenn nötig, noch etwas an und bringt ihn dann in das nächste Gefäß. Als Gefäße haben sich bewährt (Abb. 2): Für kleine Blöcke (4×5 Zellen) die Färbeküvetten nach Schiefferdecker aus Glas. Dann darf der Außendurchmesser der Schlauchstücke 13 mm nicht überschreiten. Für größere Blöcke mit 5×10 Zellen verwenden wir Polyäthylengefäß, wie in Haushaltsgeschäften erhältlich, mit Stulpdeckel (Marke Hammarplast). Sie sind am oberen Rand etwa 16 cm lang und 9 cm breit. Wenn das erste Fach eines Blocks markiert und immer die gleiche Reihenfolge der Beschriftung eingehalten wird, kann auf die Beigabe von losen Nummernschildern zu den Gewebestückchen oft verzichtet werden. Bei Verwendung mehrerer Blöcke sind diese dann natürlich zu numerieren.

Sollte eine Reparatur nötig werden, z. B. wenn sich eine Folie vom Schlauchstück löst (fehlerhafte Herstellung) oder weil eine Folie durch (grobe) Unachtsamkeit mit der Pinzette beschädigt worden oder beim Fallen eines Blocks auf eine Ecke geplatzt ist, wird nach *restlosem* Abtrennen der Folie ein kreisförmig vorgeschnittenes Stück neuer Folie aufgeschweißt und anschließend von innen her durchstochen.

Wenn Serienuntersuchungen öfter vorkommen, lohnt sich der Aufwand für die Herstellung der beschriebenen Blöcke schon in kürzester Zeit. In unserem Institut haben sich zahlreiche Blöcke in jahrelangem Gebrauch bewährt. Entsprechend der hohen Widerstandsfähigkeit von PVC (freilich nicht gegen Xylol) lassen sich die Blöcke für sehr verschiedene Zwecke verwenden.

Herrn Dr. G. H. VIEWEG und Herrn K. BÜCHLER danke ich für Ratschläge.

Zusammenfassung

Eine Einrichtung wird beschrieben, die es erlaubt, zahlreiche getrennt zu haltende, beliebig kleine Gewebestückchen (Wurzelspitzen oder junge Blättchen usw.) gemeinsam aus einer Flüssigkeit in die nächste zu überführen, wie es z. B. beim Vorbehandeln, Mazerieren und Auswaschen für Chromosomenzählungen nötig ist. Gegenüber ähnlichen Geräten anderer Autoren zeigt die Einrichtung Vorteile. Sie hat sich bei Zuckerrüben gut bewährt und ist für sehr verschiedene Zwecke geeignet.

Literatur

1. BUTTERFASS, TH.: Die Chloroplastenzahlen in verschiedenartigen Zellen trisomer Zuckerrüben (*Beta vulgaris* L.). *Z. Bot.* **52**, 46–77 (1964). — 2. MELNYK, J.: A tissue transfer device. *Stain Technology* **36**, 202–203 (1961). — 3. WALTHER, F.: Eine neue cytologische Untersuchungsmethode für *Beta*-Rüben. *Zucker* **14**, 274–276 (1961).