

Anleitung zur Herstellung von Chromosomen-Präparaten

I) Vorbehandlungen

a) Colchicin

(Colchicin arretiert die Chromosomen in der Metaphaseplatte und läßt sie stärker kondensieren)

1. 0,1 g Colchicin wird in 100 ml Aqua dest. aufgelöst. Aufbewahrung der Lösung im Kühlschrank.
2. In ein Gläschen werden ca. 1 ml der Lösung eingefüllt. Wurzelspitzen, (ca. 1,5 cm lang), Knospen, Sproßmeristeme oder andere teilungsfähige Gewebe werden abgenommen und sofort ins Colchicin eingelegt. Größere Objekte sollten aufgeschnitten werden, um das Eindringen des Colchicins zu ermöglichen.
3. Die Dauer der Behandlung ist abhängig von der Chromosomengröße und der Temperatur.
Zimmertemperatur: kleine Chromosomen: 2- 3 h
große Chromosomen: 10-15 h
Bei großen Chromosomen empfiehlt sich Kühlschranktemperatur und mindestens 30 h Inkubation.
4. Vor dem Fixieren Wurzelspitzen kurz mit Aqua dest. abspülen und mit Filterpapier abtrocknen.

b) 8-Hydroxy-Chinolin

(sehr effektiv für Pflanzen mit großen Chromosomen, die Einschnürungen werden besonders deutlich)

1. Herstellung einer 0,002 M Lösung (Molekulargewicht 145); die Lösung wird mit Aqua dest. angesetzt und solange auf 60°C erhitzt, bis sich alles gelöst hat.
2. s.o.
3. Dauer der Behandlung: ca. 4 h bei 8-10°C oder darunter, (bei Temperaturen über 18°C Verklebung der Chromosomen!)
4. s.o.

c) Eiswasser

(bevorzugte Vorbehandlung wenn eine große Zahl an Pflanzenarten untersucht werden soll)

1. Styroporbehälter mit Flockeneis füllen.
2. Die Wurzelspitzen in Leitungswasser in Schnappdeckelgläschen einlegen.
3. Gläschen mit Eis bedeckt für 12-24 h einlegen. Eine längerdauernde Behandlung würde die Chromosomen stärker verkürzen.

II) Fixierung

Carnoy's-Fixierung:

(Fällung und Polymerisation der Proteine)

1. Herstellung eines frischen Gemisches aus Methanol abs./Eisessig im Verhältnis 3 : 1
2. Wurzelspitzen direkt oder nach Vorbehandlung ins Fixativ einlegen. Fixierdauer mindestens 3-4 h, besser ca. 24 h.
3. Austausch des Fixativs gegen 70 % Ethanol; Aufbewahrung im Kühlschrank.

Formaldehyd-Fixierung:

(s.o. außerdem Polymerisation von Gerbstoffen)

1. 2g Paraformaldehyd in 25 ml H₂O bei 60-70°C einrühren
2. 1-3 Tropfen 1NaOH zugeben und verrühren (Lsg. sollte klar werden), leichte Trübung schadet nicht.
3. Mit Phosphatpuffer pH 7,4-7,6 auf 50ml auffüllen, pH 7,2.
4. Nach der Fixierung mehrmals waschen.

III) Färbungen

a) Karmin-Essigsäure-Färbung (1,5%ige Lösung von Karmin in 45% Essigsäure):

(Essigsäure ist Korrosiv und greift Linsen und Objektivfassungen an, daher sauber arbeiten!)

Herstellung der Karmin-Essigsäure:

30 g Karmin werden in 2 Liter 45%iger Essigsäure verrührt und mehrere Stunden auf kleiner Flamme vorsichtig gekocht. Am nächsten Tag wird die Lösung durch einen Faltenfilter abfiltriert. Zusätzlich kann man der Lösung noch einige Tropfen einer mit Eisenazetat gesättigten 45%igen Essigsäure oder einer 1%igen Eisenchloridlösung zugeben, bis sich die Karminessigsäure eben schwarzrot verfärbt. Vorsicht: zuviel Eisen läßt das Karmin ausflocken!

Färbung mit Karmin-Essigsäure:

1. Fixiertes Material aus 70% Ethanol in Aqua Dest. überführen. Wasser ca. 3 mal wechseln, jeweils schütteln und 10 Min. stehen lassen (die Wurzelspitzen sinken auf den Boden des Gläschens). Wenn möglich, Material mehrere Stunden in KE einlegen.
2. Material in KE mehrmals vorsichtig erhitzen bis am Rande des Schnappdeckelgläschens schlieren auftreten, nicht kochen. Vorsicht Siedeverzug: kann explosionsartig spritzen!
3. Präparation und Dauerpräparate s.u.

b) Feulgen-Färbung:

1. Fixiertes Material aus 70% Ethanol in Aqua Dest. überführen. Wasser ca. 3 mal wechseln, jeweils schütteln und 10 Min. stehen lassen (die Wurzelspitzen sinken auf den Boden des Gläschens).
2. in 5 N HCl bei 20° C 50 (-60) Minuten hydrolisieren. Hydrolyse durch Hinzufügen von kaltem Aqua Dest. abstoppen.
3. Kurz mit Aqua Dest. waschen.
4. 1-4 Stunden mit Feulgen-Reagenz färben, bis meristematische Gewebe dunkelrot erscheinen.
5. Mehrmals mit Aqua Dest. waschen und Material bis zur Weiterverarbeitung im Kühlschrank lagern (max. 1-2 Tage)
6. Präparation und Dauerpräparate s.u.

c) GIEMSA-Färbung

Giemsa-Stammlösung: Gurr Giemsa Stain improved R66 solution oder
MERCK 9204

Giemsa-Färbelösung: 3-4% Giemsa mit Mit Sörensen Phosphat-Puffer, pH 6.8 unmittelbar vor Gebrauch angesetzt.

1. Fixiertes Material aus 70% Ethanol in Aqua Dest. überführen. Wasser ca. 3 mal wechseln, jeweils schütteln und 10 Min. stehen lassen (die Wurzelspitzen sinken auf den Boden des Gläschens).
2. In 5 N HCl bei 20° C 15-20 Minuten hydrolisieren.
3. Kurz mit Aqua Dest. waschen.

4. Material für einige Minuten in 45% Essigsäure einlegen bis die zuerst trübe Wurzelspitze glasig wird. Quetschpräparate auf Objektträger in 45% Essigsäure anfertigen und Dauerpräparat herstellen (s.u.).
5. Lufttrocknen (ca. 30 Minuten)
6. 1/2 -5 min. färben mit Giemsa-Färbelösung. Es bildet sich eine Haut, die vor dem Herausnehmen der Objektträger mit einem Filterpapierstreifen abgenommen werden kann.
7. Mit Aqua dest. und Leitungswasser spülen, mit einem Fluffi Trockenblasen und Lufttrocknen.

IV) Präparation

Zuerst wird das Material in 45%iger Essigsäure kurze Zeit eingelegt. Das zu untersuchende Gewebeteil wird mit einer Nadel oder einem Skalpell herauspräpariert und auf einem fettfreien Objektträger in einem Tropfen 45% Essigsäure mit Hilfe eines glatt abgeschnittenen Metallstabes mit Präpariernadeln oder feinen Pinzetten fein zerteilt. Alle Gewebeteile, die sich nicht mazerieren lassen, werden entfernt. Daraufhin wird ein sauberes Deckglas aufgelegt. Durch leichtes Klopfen auf das Deckglas mit einer Nadelspitze werden die Zellen aus dem Verband gelöst und möglichst flach verteilt. Man saugt nun überschüssige Essigsäure mit Filterpapier ab und quetscht mit sanftem Daumendruck zwischen mehreren Lagen von Filterpapier. Dabei Scherbewegungen des Deckglases vermeiden.

V) Dauerpräparate

Das Prinzip besteht im Einfrieren des Präparates bei sehr tiefer Temperatur (ca. -70°C), wodurch das Deckglas mit einer Rasierklinge vom Objektträger abgehoben werden kann, ohne daß sich die Zellen ablösen. Hierzu wird das Präparat auf Trockeneis gelegt (Alternativ: ein Schwimmer auf Flüssigstickstoff, oder eine Kälteplatte) .

a) Weiterverarbeitung nach Karmin-Essigsäure-Färbung:

1. Präparat einfrieren.
2. Nach dem Durchfrieren des Präparates das Deckglas abheben und das Präparat trocknen lassen, danach für 5 Min. in 96% Ethanol stellen. Nach der Dehydrierung das nasse Präparat mit Euparal eindecken, ein gesäubertes Deckglas auflegen und den Überschuß unter einem Blatt Filterpapier mit mäßigem Daumendruck herausquetschen.
3. Präparat im Trockenschrank ca. 1 Woche trocknen. Euparal kann mit etwas Alkohol mühelos entfernt werden. Bei einiger Vorsicht kann das Präparat auch sofort untersucht werden, dabei darf das Objektiv aber niemals mit Euparal in Berührung kommen!

b) Weiterverarbeitung nach Feulgen- und Giemsa-Färbung:

Bei der Feulgen- und Giemsa-Färbung genügt es, wenn die fertigen Präparate eingefroren, das Deckglas abgesprengt und die Präparate luftgetrocknet werden; man erzielt auf diese Weise flachere Zellen, die besser analysiert werden können. Da die Giemsa Farbstoffe in Alkohol löslich sind, eignet sich das Eukitt als Einbettmedium besser.

Herstellen von Quetschpräparaten mit der Enzymtechnik

(nach Schwarzacher & al. 1980)

Chemikalien und Lösungen:

Cellulase 20 U/ml (ICN Biochemicals Nr. 101308)

Pectinase 50 U/ml (ICN Biochemicals Nr. 102588)

Citronensäure-Natriumcitrat-Puffer, pH 4.8:

Lösung (A)- 0.1 M Citronensäure-1-hydrat (21.01 g/l A. dest.)

Lösung (B)- 0.1 M tri-Natriumcitrat-2-hydrat (29.41 g/l A. dest.).

Für die Stammlösung 4 Teile von (A) und 6 Teile von (B) mischen.

Für Gebrauchslösung 1:9 verdünnen.

Enzymlösung: 10mg/ml Cellulase (1% w/w) plus 100mg/ml Pectinase (10% w/w) mit 0.01 M Citrat-Puffer (pH 4.8) ansetzen. Gefroren im Tiefkühlschrank aufbewahren. Je nach Objekt kann es nötig sein, die Enzymkonzentration abzuschwächen oder zu erhöhen.

Quetschpräparate dienen als Ausgangsmaterial für die Giemsa-Färbung, Giemsa C-Bänderung, die Färbung mit Fluorochromen und für die Silberimprägnierung.

Durchführung:

1. Die vorbehandelten und fixierten Meristeme ca. 15 min im 0.01 M Citrat-Puffer (Gebrauchslösung!) waschen (Puffer mehrmals wechseln).
2. Meristeme ins Cellulase-Pectinase-Enzymgemisch transferieren.
Die Mazeration erfolgt im Wärmeschrank (oder im Wasserbad) bei 37°C für 15-90 min. (kontrollieren!), wobei größere Meristeme bzw. ältere Fixierungen länger behandelt werden müssen. Es ist aber darauf zu achten, die zur Auflösung der Zellwände gerade notwendige Einwirkdauer nicht wesentlich zu überschreiten.
3. Meristeme nach der Mazeration erneut 15-30 min. im Citrat- Puffer waschen (Vorsicht, die Meristeme sind jetzt sehr weich!).
4. Meristeme in ein Blockschälchen oder Uhrglasobjektträger mit 45% Essigsäure übertragen und einige Minuten durchtränken lassen. Je ein Meristem auf einem sauberen und fettfreien Objektträger in einem kleinen Tropfen 45% Essigsäure sorgfältig zerzupfen, Deckglas auflegen, sehr vorsichtig mit einer Nadel draufklopfen, überschüssige 45% Essigsäure absaugen und Präparat schließlich zwischen mehreren Lagen von Filterpapier (Filterblock) quetschen. Mit dem Glasschreiber kennzeichnen.
5. Präparat auf Trockeneis einfrieren. Deckglas absprengen. Präparat lufttrocknen.

6. Mikroskopische Erfolgskontrolle der Quetschpräparate ist mit einem

Phasenkontrastmikroskop auch ohne Färbung möglich.

keine Ölimmersion
maximal 40x Objektiv verwenden.

Giemsa-Färbung, Giemsa-C-Bänderung und Silberimprägnierung können schon am darauffolgenden Tag durchgeführt werden.

Für die Färbung mit Fluorochromen sollten die Präparate zumindest mehrere Tage alt sein.

Bessere Differenzierung kann man erzielen, wenn man die Präparate bis zu einige Wochen bei Zimmertemperatur altern läßt.

Literatur:

Schwarzacher, T., Ambros, P., Scinweizer, D., 1980: Application of Giemsa banding to Orchid karyotype analysis. - Plant Syst. Evol. 134, 293-297.

Silberimprägnierung

(nach der Ag-Technik von Bloom & Goodpasture 1976, modifiziert nach Kodama & al. 1980)

Die Silberimprägnierung wird angewendet, um in Kernen die Nucleolen und in Chromosomen die Nucleolus-organisierenden Regionen (NORs) dunkelbraun bis schwarz zu färben.

Silbernitrat-Lösung:

50%ig (0.5 g AgNO₃ in 1 ml A. bidest.)

Nylonnetz:

243 mym Maschenweite (Nybolt Seidenbeutel Tuch PA-243/43 Schweiz. Seidengazefabrik, Zürich), zugeschnitten auf Deckglasgröße (ca. 20 x 25 mm).

Durchführung:

1. Auf das Quetschpräparat wird ein größerer Tropfen der Silbernitrat-Lösung aufgebracht und dieser mit dem Nylonnetz bedeckt.
2. Das Präparat in eine feuchte Kammer legen (z.B. Petrischale mit befeuchtetem Filterpapier auslegen) und im Wärmeschrank bei 37°C 1 bis mehrere Stunden färben. Den Stand der Färbung mehrmals unter einem Binokular überprüfen.
3. Sobald die Nucleolen in den Interphasekernen dunkelbraun bis schwarz erscheinen, Nylonnetz mit A. dest. abschwenken (Abfallflasche!) und Präparat gründlich mit A. dest. abspülen. Trockenblasen.
4. Präparat mit De-Pe-X eindecken oder uneingedeckt mit Ölimmersion betrachten.

Anmerkungen:

Statt bei 37°C kann die Färbung auch bei 60°C und kürzerer Inkubationszeit durchgeführt werden. Es ist darauf zu achten, daß die Präparate nicht austrocknen. Zu große Feuchtigkeit in der Kammer ist allerdings ebenfalls zu vermeiden, da sonst die Silbernitrat-Lösung die Feuchtigkeit aufnimmt und dabei verdünnt wird.

Häufig ergeben Quetschpräparate, hergestellt mit der Enzym-Technik, eine sehr schwache oder gar keine Silberimprägnierung. Man sollte dann versuchen, Quetschpräparate ohne Enzymmazeration herzustellen: Das fixierte Meristem wird 5-10 min. in 45% Essigsäure

eingelegt und dann direkt auf dem Objektträger in einem Tropfen 45% Essigsäure mit Hilfe eines vorne flachpolierten Kupferstabes zerstampft. Große Partikel werden mit einer Pinzette entfernt, ein Deckglas wird aufgelegt, mit der Nadel draufgeklopft, und das Präparat zwischen Filterpapierlagen gequetscht. Präparat einfrieren, Deckglas absprengen, Präparat trocknen lassen.

Vorsicht: Silbernitrat ist relativ giftig und hinterläßt auf Möbeln, Kleidung und Haut häßliche Flecken, die nicht wieder entfernt werden können, deshalb sollte sehr sorgfältig und nur an dem dafür vorgesehenen Platz gearbeitet werden!

Literatur:

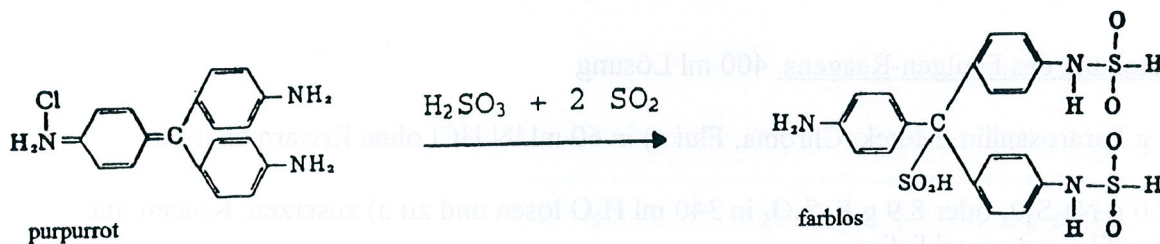
Bloom, S.E., Goodpasture, C., 1976: An improved technique for selective silver staining of nucleolar organizer regions in human chromosomes. - Hum. Genet. 34, 199-206.

Kodama, Y., Yoshida, M.C., Sasaki, M., 1980: An improved silver staining technique for nucleolus organizer regions by using nylon cloth. - Japan. J. Hum. Genet. 25, 229-233.

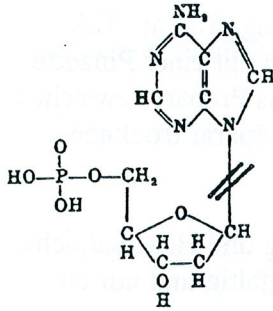
Zur Kern und Chromosomenfärbung mit der Feulgen-Reaktion
(Nuklear-Reaktion nach Feulgen & Rossenbeck, 1924)

Prinzip: Farbloses Schiff'sches Reagens (=fuchsin-schwefelige Säure, Leukofuchsin) reagiert mit den durch milde saure Hydrolyse freigelegten Aldehydgruppen am C1-Atom der Deoxyribose der DNA unter Bildung eines purpurroten Additionsprodukts.

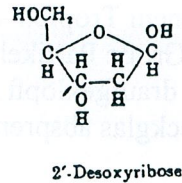
1. Das Schiff'sche Reagens entsteht bei der Einwirkung von SO₂ auf (purpurrotes) basisches Fuchsin bei saurem pH. Basisches Fuchsin ist ein Gemisch verwandter Farbstoffe mit der Hauptkomponente Pararosanilin.



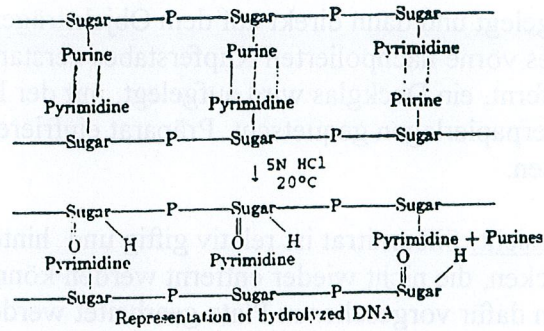
2. Die Freilegung der Aldehydgruppen der DNA erfolgt durch Hydrolyse in 5N HCl bei 20°C für 60 min. Dabei spalten sich Purine vom C1-Atom der Deoxyribose ab. Der Übergang von der Ringform in die Kettenform ist die Voraussetzung für die Bildung einer reaktiven Aldehydgruppe. Dieser Übergang erfolgt bei der Ribose wesentlich langsamer, weswegen die Feulgen-Reaktion für RNA weitgehend negativ ausfällt.



DNA-Nukleotid mit Adenin als Base



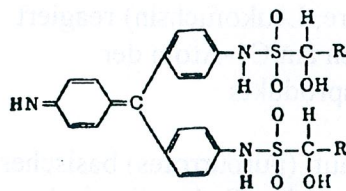
2'-Desoxyribose



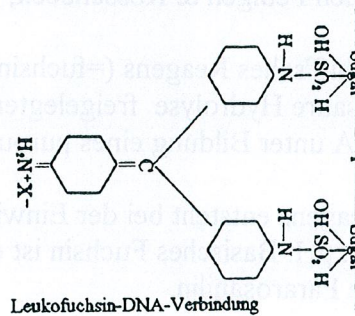
Representation of hydrolyzed DNA

Gleichzeitig mit der Depurinierung erfolgt stets jedoch auch eine Depolymerisierung der Zucker-Phosphat-Kette der DNA, weshalb die Hydrolyse nicht beliebig ausgedehnt werden kann, sondern ein Färbungs-Optimum der Hydrolysedauer ermittelt werden muß.

3. Die Additionsreaktion des Leukofuchsin mit den Aldehydgruppen der Deoxyribose führt zur Bildung einer wieder purpurrot gefärbten Verbindung deren Absorptionsmaximum bei 560 nm liegt. Unter definierten Bedingungen verläuft die Feulgen Reaktion quantitativ und wird daher für die cytophotometrische DNA-Mengenbestimmung verwendet
Leukofuchsin- Aldehyd-Verbindung.



Leukofuchsin-Aldehyd-Verbindung



Leukofuchsin-DNA-Verbindung

Herstellung des Feulgen-Reagens: 400 ml Lösung

- 2 g Pararosanilin (Merck, Chroma, Fluka) in 60 ml 1N HCl ohne Erwärmen lösen.
- 7.6 g $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ oder 8.9 g $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_5$ in 340 ml H_2O lösen und zu a) zusetzen. Kolben mit Parafilm gut verschließen.
- Mischung über Nacht rühren. Lösung wird cognacbraun bis strohgelb (Farbe stammt von Verunreinigungen).
- Zur Entfernung der Verunreinigungen wird Aktivkohle eingerührt (etwa 1g). Die Flüssigkeit selbst soll nun farblos erscheinen.
- Nun wird die Lösung abgenutscht. Es resultiert ein farbloses Reagenz.
Hinweis: Filterpapier doppelt nehmen, mit A. dest. anfeuchten. Entfernung der Aktivkohle soll in einem Arbeitsgang erfolgen, um möglichst kein SO_2 zu verlieren. Lösung gut verschlossen im Kühlschrank lagern.
Pararosanilin ist karzinogen, Hautkontakt vermeiden!