

# Arbeitsmethoden

Objektyp: **Chapter**

Zeitschrift: **Acta Tropica**

Band (Jahr): **28 (1971)**

Heft 2

PDF erstellt am: **13.09.2024**

## **Nutzungsbedingungen**

Die ETH-Bibliothek ist Anbieterin der digitalisierten Zeitschriften. Sie besitzt keine Urheberrechte an den Inhalten der Zeitschriften. Die Rechte liegen in der Regel bei den Herausgebern.

Die auf der Plattform e-periodica veröffentlichten Dokumente stehen für nicht-kommerzielle Zwecke in Lehre und Forschung sowie für die private Nutzung frei zur Verfügung. Einzelne Dateien oder Ausdrucke aus diesem Angebot können zusammen mit diesen Nutzungsbedingungen und den korrekten Herkunftsbezeichnungen weitergegeben werden.

Das Veröffentlichen von Bildern in Print- und Online-Publikationen ist nur mit vorheriger Genehmigung der Rechteinhaber erlaubt. Die systematische Speicherung von Teilen des elektronischen Angebots auf anderen Servern bedarf ebenfalls des schriftlichen Einverständnisses der Rechteinhaber.

## **Haftungsausschluss**

Alle Angaben erfolgen ohne Gewähr für Vollständigkeit oder Richtigkeit. Es wird keine Haftung übernommen für Schäden durch die Verwendung von Informationen aus diesem Online-Angebot oder durch das Fehlen von Informationen. Dies gilt auch für Inhalte Dritter, die über dieses Angebot zugänglich sind.

### III. Arbeitsmethoden

#### A. Autoradiographie

Der Proteinvorläufer 3H-L-Leucin kam als Tracer zur Anwendung. Den 0,25 g schweren Zeckenweibchen wurden 10 Tage nach Blutmahlzeit und Begattung (gilt für Experiment A, B, C und D) je 5  $\mu$ C 3H-L-Leucin (Radiochemical Centre Amersham, England) in physiologischer NaCl-Lösung durch eine Coxa in die Haemolymphe des Haemocoels injiziert. Die Sektion der Ovarien von je 5 Zecken erfolgte 1, 5, 10, 15, 30, 60, 120, 240 Min. und 6 Std. nach der Injektion direkt im Vorfixierungsmittel.

Dabei wurde jeweils kurz vor der Sektion durch Abschneiden einer Extremität auf der Höhe der Coxa der «heiße» Hämolymphtropfen (= Hämolymphe + radioaktiver Tracer) zurückgewonnen und sofort in die Hämolymphe von Zecken einer zweiten Versuchsserie injiziert. Dieser sekundäre Versuch diente neben der Beobachtung der Darmepithelmarkierung (siehe 1a) dazu, den Zeitpunkt zu ermitteln, bei welchem der Tracer nicht mehr als Aminosäure, sondern als bereits synthetisiertes Protein zur Verfügung stand. Die Tiere der zweiten Serie wurden nach 1, 5, 10, 30, 60, 120 und 240 Min. sezziert.

Anschließend wurden die gewonnenen Organe nach den folgenden Vorschriften (s. 1b und folgende Kapitel) weiter präpariert:

#### 1. Lichtmikroskopische Autoradiographie

##### a. Präparation ganzer Zecken

Um die Aufnahme und Verteilung der injizierten Isotopsubstanz im ganzen Zeckenkörper zu kontrollieren, wurden je 2 ganze Zecken 15, 30, 60, 90 und 120 Min. nach der Injektion während 6 Std. in Bouin Duboscq fixiert. Dabei entfernte man die 8 Extremitäten und das Rostrum, um das Eindringen der Präparationslösungen zu erleichtern. Die anschließende Entwässerung erfolgte über eine Alkohol-Aceton-Propylenoxidreihe, die Einbettung in Epon.

Die Polymerisation dauerte 72 Std. bei 60° C. 6  $\mu$  dicke Schnitte wurden auf dem Knochenmikrotom 1120 (Jung) hergestellt und auf Glasobjektträger bei 60° C aufgeklebt.

##### b. Präparation der Ovocyten

Die freipräparierten Ovarien mit den Ovocyten in allen Reifestadien wurden mit 3% Glutaraldehyd in 0,1 M Cacodylatpuffer (CP), pH 7,3, während 3 Std. bei 4° C vorfixiert. Das Auswaschen des Vorfixierungsmittels erfolgte in 0,1 M CP + 5% Saccharose während 8 Std. bei 4° C. Nachfixation mit 2% OsO<sub>4</sub> in 0,2 M CP, pH 7,3, während 2 Std. bei 4° C. Entwässerung über die aufsteigende Acetonreihe + Propylenoxid. Eingebettet wurde in Epon.

Um mit Hilfe eines lichtmikroskopischen Vorversuches den Aktivitätsgrad des Isotops zu eruieren, wurden vorerst mit Glasmessern auf dem Reichert OmU<sub>2</sub> Schnitte von 2  $\mu$  Dicke hergestellt und auf Objektträger gebracht.

Autoradiographische Verarbeitung der unter a und b gewonnenen Präparate durch Aufbringen der Emulsionschicht mittels der Eintauchmethode (MARKUS 1965).

Es kamen die Ilford-Emulsionen G5 und K5 zur Anwendung (mit Aqua bidest.

1 : 1 verd.). Die Expositionszeit im Tiefkühlschrank betrug 10 bis 20 Tage. Entwicklung der Autoradiogramme mit Agfa Metinol U, Fixierung mit gesättigter Natriumthiosulfatlösung. Anschließende Schnitffärbung mit Azur-II-Methylenblau.

## 2. Elektronenmikroskopische Autoradiographie

Ultradünnschnitte (Reichert OmU<sub>2</sub>) der Ovocytenpräparate wurden auf colloidumbefilmte Kupfernetze gebracht; und mit Uranylacetat und Bleicitrat nachkontrastiert. Eine aufgedampfte Kohlschicht von ca. 50 Å Dicke verhinderte eine Reoxidation von Gewebsteilen. Bei unseren Versuchen kamen die Ilford-Emulsionen L4 und K2 zur Anwendung, wobei vor allem L4 wegen der kleineren Silberbromidkristallgröße ausgewertet wurde.

Aufbereitung der Emulsionen nach CARO & VAN TUBERGEN (1962).

Eine geringe Emulsionsmenge wurde mit einer Mikropipette aufgezogen, mit dem Mund eine Blase gebildet und diese über den Schnitten zum Platzen gebracht (CARO 1961; ROHR et al. 1965, 1967).

Zur Beurteilung des Emulsionsfilmes wurden Leerkontrollen hergestellt. Der Nulleffekt war unerheblich und konnte vernachlässigt werden. Expositionszeit: 12 Wochen bei Dunkelheit im Tiefkühlschrank (SALPETER & BACHMANN 1964).

Entwicklung mit Kodak Mikrodol X für L4 und Agfa Metinol U für K2; Fixierung mit gesättigter Natriumthiosulfatlösung.

Zum Teil wurde von den noch feuchten Präparaten durch kurzes Flottieren auf 0,5 N Essigsäure bei 37° C die Gelatineschicht entfernt (CARO 1962; MOSES 1964).

70% der hergestellten Autoradiogramme waren von guter Qualität und konnten für die Auswertung verwendet werden.

Pro Versuchszeit wurden die Silberkornfilamente auf je 20 Schnitten ausgezählt (Tab. 1 und 2). Eine semiquantitative Auswertung, d. h. die Kombination von Silberkornauszählung und Morphometrie, konnte nicht durchgeführt werden, da die Morphometrie der Zellkompartimente wegen deren starken Dynamik im Rahmen dieser Arbeit nicht mehr möglich war.

### B. Ferritinexperiment

Ferritin, ein Protein mit einem mittleren Moleküldurchmesser von 94 Å, enthält bis zu 40% Eisenhydroxid in Form eines etwa 55 Å großen elektronendichten Kerns (FARRANT 1954).

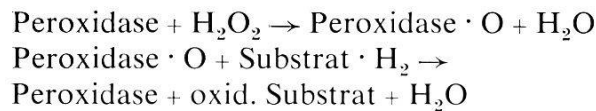
Das Ferritin (aus Pferdemicke, Fluka) wurde als 50%-Lösung durch Cellophan gegen Aqua bidest. dialysiert, um die toxischen Bestandteile möglichst zu eliminieren, und nachher lyophilisiert.

15% Ferritin, gelöst in NaCl physiol., injizierte man in das Hämocoel der Zeckenweibchen. Die Tiere wurden 1, 5, 10, 30, 60, 120, 240 Min. und 6 Std. nachher im Vorfixierungsmittel sezirt. Daneben erfolgte ein Versuch an Ovarien *in vitro* mit den Inkubationszeiten: 1, 5 und 10 Min.

Weiterbehandlung: siehe unter A 1b.

### C. Peroxidaseexperiment

Peroxidasen katalysieren die Oxidation eines Substrates durch Wasserstoff-superoxid nach folgendem vereinfachten Schema:



(vgl. GEYER 1969).

Als Substrat wurde das Karnovsky-Medium 3'3-Diaminobenzidin-tetrahydrochlorid (DABTH) verwendet (FRIEND 1967; GRAHAM 1966; KARNOVSKY 1965, 1967; LOCKE 1968; STRAUS 1964).

Präparation: Zeckenmaterial und Inkubationszeiten der Peroxidase *in vivo* und *in vitro* wie unter A und B.

Injektion in das Hämocoel von 1 mg Meerrettichperoxidase (Boehringer Typ 2) pro Zecke, gelöst in NaCl physiol. Vorfixierung der Ovarien und Ovocyten mit 3% Glutaraldehyd in 0,1 M CP, pH 7,3, 3 Std. bei 4° C. Auswaschen in 0,1 M CP + 5% Saccharose, ca. 8 Std. bei 4° C.

Die Organe wurden anschließend während 30 Min. inkubiert. Inkubationsgemisch: 10 ml 0,05 M Tris-HCl-Puffer; 3,5 g DABTH (Sigma); 0,4 ml Perhydrol Merck 30%/1 : 100 mit H<sub>2</sub>O verdünnt, pH 7,5–7,6, bei Raumtemperatur.

Zur Kontrolle wurden Ovarien und Ovocyten ohne vorherige Peroxidasebehandlung ebenfalls inkubiert, um eine eventuelle Pseudoperoxidase nachzuweisen.

Nachher kurzes viermaliges Auswaschen: 1. 0,05 M Tris-HCl-Puffer (pH 7,5–7,6); 2. NaCl physiol.; 3. + 4. 0,05 M Tris-HCl-Puffer.

Nachfixieren und weitere Präparationsschritte wie unter A und B.

Die Schnitte der Experimente B und C wurden nicht nachkontrastiert. Die Aufnahme erfolgte auf den Elektronenmikroskopen Zeiss EM 9 und Philips EM 300.

#### D. Polysaccharidnachweis

Die Präparation der Ovarien mit den Ovocyten erfolgte 10 Tage nach Blutmahlzeit und Begattung wie unter A 1b. Das Vorhandensein von Glykogen und anderen Polysacchariden in den Ovocyten wurde mit cytochemischen Methoden (THIERY 1967; 1969; LONGO & ANDERSON 1970) an Ultradünnschnitten durch Flottieren auf den verschiedenen Lösungen nachgewiesen.

1. Kontrolle: 0,1 M Cacodylatpuffer, 12 Std., 37° C.

2.  $\alpha$ -Amylasebehandlung: 0,1%  $\alpha$ -Amylase, 12 Std., 37°.

3. Oxydation der Polysaccharide (LONGO & ANDERSON 1970): 3,2% Periodic-acid (PA)- 1Std., 23° C. Nachkontrastieren mit Uranylacetat und Bleicitrat.

4. PA-TCH-Albumosesilber-Methode (THIERY 1967, modifiziert): a) 1% PA, 35 Min., 23° C. b) Mehrfaches Waschen, Aqua bidest., 1 Std., 23° C. c) 0,2% Thio-carbohydrazid (TCH) in 20% Essigsäure, 0,5, 1, 24, 48, 72 Std., 23° C. d) Waschen: 10% Essigsäure, 15 Min., 23° C; 5% Essigsäure, 15 Min., 23° C; 3 × Aqua bidest., 15 Min., 23° C. e) 1% Albumosesilber in Aqua bidest., 30 Min., 23° C. f) Waschen: Aqua bidest., 20 Min., 23° C.

5. Um die Spezifität der Methode 4. nachzuprüfen, wurden die von THIERY (1967, 1969) angegebenen Kontrollen angewendet.

## IV. Resultate

### A. Morphologie der weiblichen Geschlechtsorgane

In den lichtmikroskopischen Arbeiten von AESCHLIMANN (1958), BALASHOV (1964), BURGDORFER (1951), DIEHL (1969, 1970), LEES &