

Isolierung von Zellkernen aus Zwiebelwurzeln

Autor(en): **Accola, Paul**

Objektyp: **Article**

Zeitschrift: **Berichte der Schweizerischen Botanischen Gesellschaft = Bulletin de la Société Botanique Suisse**

Band (Jahr): **70 (1960)**

PDF erstellt am: **26.09.2024**

Persistenter Link: <https://doi.org/10.5169/seals-49491>

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.

Isolierung von Zellkernen aus Zwiebelwurzeln

Von *Paul Accola*

Aus dem Institut für allgemeine Botanik der
Eidgenössischen Technischen Hochschule, Zürich

Eingegangen am 3. August 1960

| | Seite |
|---|-------|
| 1 Einleitung und Problemstellung | 353 |
| 2 Eigene Untersuchungen | 354 |
| 21 Material | 354 |
| 22 Mikroskopischer Nachweis von Zellkernmaterial | 355 |
| 22.1 Allgemeines | 355 |
| 22.2 Färbungen für das Hellfeld | 357 |
| 22.3 Färbungen mit Fluorochromen | 357 |
| 23 Quantitative Erfassung des Zellkernanteiles | 359 |
| 23.1 Klassifizierung der Sedimentskomponenten | 359 |
| 23.2 Prinzip des Integrationsokulares und Auswertung der Ergebnisse | 360 |
| 23.3 Volumenkorrektur | 362 |
| 24 Medium | 364 |
| 24.1 Allgemeines | 364 |
| 24.2 Substanzverlust der Kerne im Medium | 364 |
| 24.3 Wirkung von 0,002 <i>m</i> CaCl ₂ | 368 |
| 24.31 CaCl ₂ und Kerngröße | 368 |
| 24.32 CaCl ₂ und Kernaussbeute | 369 |
| 24.33 CaCl ₂ und Erhaltung der Zellkerne | 371 |
| 25 Homogenisation | 372 |
| 25.1 Wirkung verschiedener Homogenisatoren | 372 |
| 25.2 Versuche mit Pektinasen | 375 |
| 26 Fraktionierung | 376 |
| 26.1 Filtration | 377 |
| 26.2 Fraktionierung durch Zentrifugieren | 378 |
| 26.3 Ultrazentrifuge | 382 |
| 27 Standardmethode | 384 |
| 28 Fixierung der Sedimente | 384 |
| 29 Elektronenmikroskopische Kontrolle der Sedimente | 384 |
| 3 Diskussion | 386 |
| 4 Zusammenfassung | 390 |
| Literatur | 392 |

1 Einleitung und Problemstellung

Über die chemische Zusammensetzung tierischer Zellkerne bestehen viele Untersuchungen, vor allem über ihren Protein- und Nukleinsäuregehalt. Auch die spezifische Zusammensetzung dieser Komponenten konnte für viele Kerntypen abgeklärt werden (z. B. Chargaff, 1955). Von pflanzlichen Zellkernen dagegen sind kaum eingehendere Analysen bekannt.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit besteht darin, eine Methode zu finden zur Anreicherung von Zellkernen aus leicht erhältlichem Material höherer Pflanzen, wobei die Beschaffenheit der angereicherten Kerne deren quantitative chemische Analyse erlauben soll. Ferner sollen Art und Ausmaß der Verunreinigung mit anderem Zellmaterial genau untersucht werden; denn für quantitative chemische Analysen von Zellkernpräparaten ist es natürlich von entscheidender Bedeutung, deren Reinheitsgrad zu kennen.

Verschiedene Umstände erleichtern die Anreicherung von relativ reinem tierischem Zellkernmaterial:

1. Homogenes Ausgangsmaterial kann leicht in ausreichender Menge beschafft werden, weil die Tiere relativ große Organe mit gleichartigem Gewebe, wie z. B. die Leber, besitzen. Ferner entfällt in Drüsen, wie Pankreas, Milz, Leber usw., ein relativ großer Teil des Zellvolumens auf den Kern; bei pflanzlichen Geweben dagegen ist das Volumen des Zellkerns gegenüber dem Volumen der vakuolisierten, ausgewachsenen Zelle klein. Für ein entsprechendes Zellkernquantum muß daher viel mehr frisches Pflanzenmaterial (Blätter, Wurzeln usw.) aufgearbeitet werden.

2. Die Zellen tierischer Gewebe besitzen keine resistente Zellulosemembran und sind leicht aufzuschließen, ohne daß der Kern dabei Schaden leidet. Bei pflanzlichen Geweben dagegen ist es schwierig, die Zellulosemembranen genügend aufzuschließen, ohne den Kern zu schädigen.

3. In Tierzellen sind im Vergleich zum Zellkern alle übrigen Zellbestandteile klein; in Pflanzenzellen dagegen können Plastiden und Stärkekörner eine dem Zellkern vergleichbare Größe erreichen, und Homogenate enthalten Zellwandstücke verschiedenster Größe. In der tierischen Zelle ist der Zellkern (meistens) die dichteste Komponente; im Gegensatz dazu sind in der pflanzlichen Zelle die einen Komponenten, nämlich die Zellulosemembranen und die Stärkekörner, dichter, die anderen – z. B. Plastiden und Mitochondrien – weniger dicht als der Kern. All dies macht die Fraktionierung von Pflanzenhomogenaten schwieriger.

Cutter et al. (1952) reicherten Zellkerne aus dem «Syncytium» des jungen Kokosnuß-Endospermes («Kokosmilch») an und entgingen so dem Problem des Zellwandaufschlusses. Normalerweise aber ist bei Pflanzen

mit einer mehr oder weniger festen Zellwand zu rechnen, die bei der Gewebehomogenisierung zerschlagen werden muß.

Die Homogenisierung und Fraktionierung zur Gewinnung von Zellkernen kann in wäßrigem oder nichtwäßrigem Milieu erfolgen. Im zweiten Falle werden die Gewebe durch Gefriertrocknung oder durch mit Wasser mischbare organische Flüssigkeiten, wie Azeton, entwässert; das Trockenpulver wird zermahlen, und seine einzelnen Komponenten – Zellkerne, Mitochondrien usw. – werden auf Grund ihrer verschiedenen Dichte in Gemischen von indifferenten organischen Flüssigkeiten durch Zentrifugieren getrennt. Mit dieser Methode gehen bei der Aufbereitung der Kerne weder Proteine, Nukleotide noch irgendwelche anderen wasserlöslichen Stoffe verloren, höchstens ein Teil der Lipide. Ein großer Nachteil ist, daß die Kerne häufig die Tendenz zeigen, mit Zytoplasmateilchen zu agglutinieren, und daß während der Prozedur ihre ursprüngliche Form verlorengeht (kantige Kerne oder evtl. kleine Kerntrümmer), so daß in den resultierenden Fraktionen die Form der Teilchen wenig zu ihrer Identifizierung beitragen kann. Die Entwicklung dieser Technik stammt von Behrens (z. B. 1956). Wenn pflanzliche Zellkerne nach dieser Methode aufbereitet wurden (Feulgen, Behrens und Mahdihassan, 1937; Stern und Mirsky, 1952), wählte man als Ausgangsmaterial bezeichnenderweise relativ wasserarmes Gewebe, nämlich Embryonen ungekeimter Getreidekörner.

Ich entschied mich für die Zellkernisolierung in wäßrigem Milieu, um die Fraktionen auch morphologisch kontrollieren zu können.

Johnston et al. (1957) reicherten in konzentriertem Rohrzuckermedium Zellkerne aus Embryonen ungekeimten Weizens an und Johnston und Setterfield (1959) solche aus Embryonen ungekeimter Erbsen. Brown (1951) setzte Zellkerne aus mit Pektinase mazerierten *Allium-Cepa*-Wurzeln frei.

In all den genannten Arbeiten finden sich keine eingehenderen Angaben über Art und Ausmaß der Verunreinigung der gewonnenen Kernpräparate mit anderen Zellkomponenten.

2 Eigene Untersuchungen

21 Material

Die meisten Untersuchungen wurden an Wurzeln von *Allium Cepa* durchgeführt. Zu Vorversuchen wurden ferner verwendet: Schuppenparenchym von *Allium Cepa*, junge Blättchen von *Spinacea oleracea* und reifes Fruchtfleisch von *Symphoricarpus racemosus*.

Zwiebelwurzeln haben vor Blättern den Vorteil, daß sie keine Chloroplasten, und vor Wurzeln anderer Gattungen den Vorteil, daß sie keine größeren stärkehaltigen Leukoplasten besitzen. Auch die Zwiebelschuppen enthalten große Mengen von Leukoplasten. Chloroplasten und andere Plastiden vergleichbarer Größenordnung stören, wenn man versucht, die Zellkerne mit Hilfe einer auf Größenunterschieden der Zellkomponenten beruhenden Fraktionierung des Gewebehomogenates anzureichern.

Das reife Fruchtfleisch von *Symphoricarpus* zeigte bei der Gewebehomogenisierung den Vorteil, daß sich die Zellen mit dem Mörser- oder Kugelstößel (Dounce-Homogenisator) sehr leicht voneinander trennen ließen. Doch sahen im Mikroskop die Zellkerne nicht so vital aus wie jene in jungem Wurzelgewebe oder in jungem Blattparenchym. In manchen Zellen schienen sie in Auflösung begriffen und hoben sich kaum mehr vom Zytoplasma ab. Lauber (1947) beobachtete im reifen Fruchtfleisch verschiedener Arten, daß die Zellkerne gealtert erschienen und ihre Reaktionsfähigkeit eingebüßt hatten. Weil möglicherweise die Fruchtfleischkerne von *Symphoricarpus* ebenfalls degeneriert sind, verzichtete ich im weiteren auf dieses Objekt.

Die Zwiebeln wurden auf Brunnenwasser getrieben. Wurden sie im Tageslicht belassen, so daß die austreibenden Blätter assimilieren konnten, fanden sich in Quetschpräparaten oder in Homogenaten solcher Wurzeln beträchtliche Mengen kleine und größere Stärkekörner (bis hinauf zu 10μ Durchmesser) vor. In der Folge wurden die Zwiebeln im Dunkeln gehalten und die austreibenden Blätter jeweils abgeschnitten. So konnte die störende Stärkebildung unterdrückt werden.

22 Mikroskopischer Nachweis von Zellkernmaterial

22.1 Allgemeines

Um im Homogenat oder Sediment Zellkerne und Zellkernfragmente von Zellwänden und Zytoplasmateilchen unterscheiden zu können, wurden in Kombination verschiedene mikroskopische Untersuchungsmethoden angewandt: Hellfeld-, Phasenkontrast-, Dunkelfeld-, Fluoreszenz- und Polarisationsmikroskopie.

Ungefärbte Präparate zeigen im Hellfeld zu wenig Kontrast, so daß das Phasenkontrastmikroskop zu Hilfe genommen werden muß.

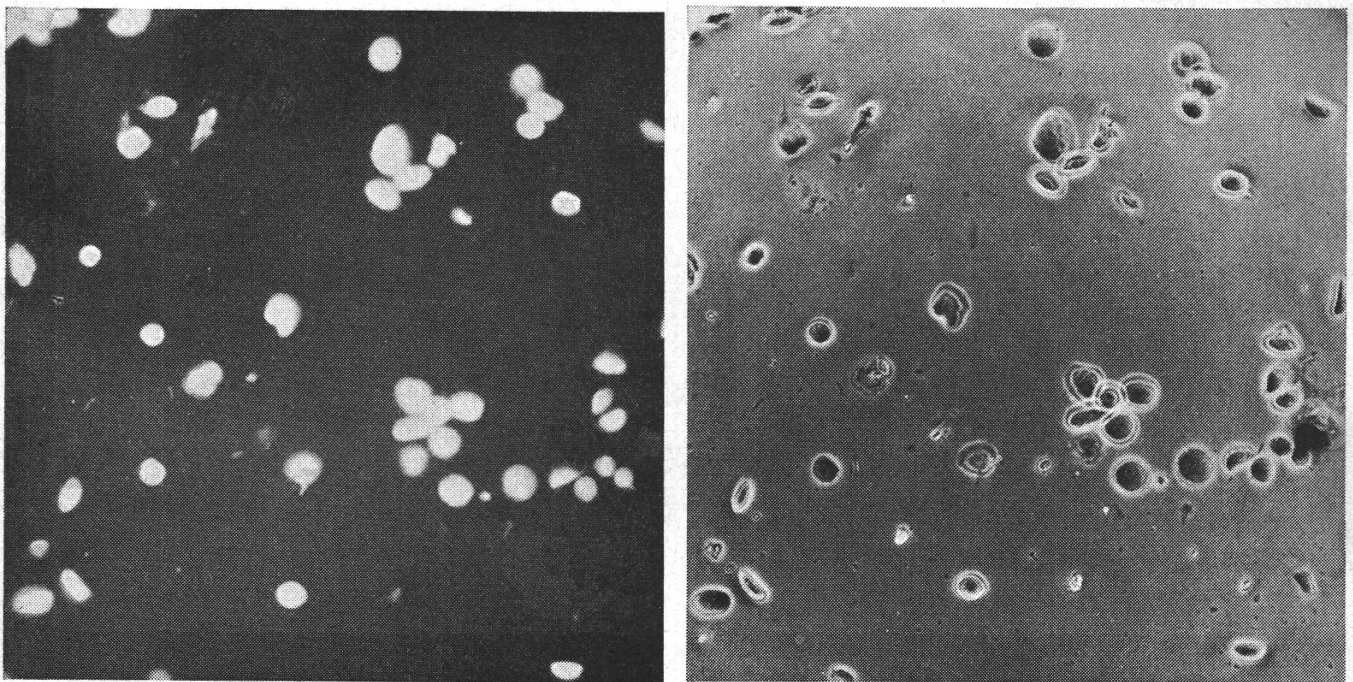
Im Dunkelfeld erscheinen helle Beugungsbilder der Teilchen auf dunklem Hintergrund. Auch submikroskopische Teilchen können auf diese Weise sichtbar gemacht werden. Das Dunkelfeld erlaubt somit eine gewisse Kontrolle über die Gegenwart submikroskopischer Verunreinigungen in den Kernsedimenten. Ein weiterer, wichtiger Vorteil des Dunkelfeldes liegt darin, daß sehr kleine Teilchen auf Grund ihrer Lichtbeugung auf dunklem Hintergrund leichter wahrgenommen werden als auf

Grund ihrer Lichtabsorption und Lichtbrechung (Hellfeld und Phasenkontrast) auf hellem Hintergrund. Ein großer Nachteil besteht dagegen im Fehlen einer formgerechten Abbildung solcher Teilchen, da sie eben nur als Beugungsscheibchen sichtbar werden. So können z. B. Zuckerkristalle ohne weiteres mit zelleigenen Teilchen verwechselt werden.

Auch das Fluoreszenzmikroskop bietet den Vorteil heller Teilchen auf dunklem Hintergrund. Und zwar erscheinen die (fluorochromierten) Teilchen im Gegensatz zum Dunkelfeldverfahren als Selbstleuchter, weil sie bei UV-Bestrahlung sichtbares Licht emittieren. (Zellkern und Zytoplasma der Zwiebelwurzeln zeigten keine charakteristische Eigenfluoreszenz.)

Figuren 1 und 2 veranschaulichen den Unterschied zwischen einem Fluoreszenz- und einem Phasenkontrastbild isolierter Zellkerne. (Sediment nach 27 hergestellt und nach 22.3 fluorochromiert.)

Stärkekorner und Zellwände sind doppelbrechend, wodurch sie in polarisiertem Licht vom Zellkern und von Zytoplasmateilchen unterschieden werden können.



Figuren 1 und 2

Zellkernsuspension, hergestellt nach 27. Gleiches Gesichtsfeld im
Fluoreszenzbild

Phasenkontrastbild

Vergrößerung 400 ×

Um die Identifizierung der Zellpartikel im Hellfeld- oder im Fluoreszenzmikroskop zu erleichtern, wurde nach einer möglichst spezifischen Kernfärbung gesucht.

22.2 Färbungen für das Hellfeld

Zwiebelschuppenparenchym, Zwiebelwurzeln, Fruchtfleisch von *Symphoricarpus* oder junge Spinatblätter wurden in 10%iger (0,3 m) Rohrzuckerlösung homogenisiert und zentrifugiert. Die Sedimente wurden mit folgenden basischen Farbstoffen gefärbt: Pyronin, Methylgrün, Gallocyanin und Kristallviolett. Die Färbung erfolgte durch Suspension der Sedimente in verdünnter Farblösung (mit oder ohne vorherige Fixierung der Suspensionen mit Äthanol oder 1%iger Osmiumsäure) oder an eingetrockneten Ausstrichen (fixiert oder unfixiert). Das zweite Verfahren zeigte den Nachteil, daß ein unkontrollierbarer Anteil des Ausstriches während des Färbens abgelöst wurde, obwohl die Objektträger mit Eiweißglyzerin bestrichen worden waren. Das Resultat dieser Färbungen war unbefriedigend: Das Kernmaterial erschien ungleichmäßig und meist schwach gefärbt, und auch andere als Kernpartikel zeigten eine gewisse Affinität zu den Farbstoffen (z. B. Zellwandbruchstücke). Das Bild solcher Präparate war eher weniger klar als Phasenkontrastbilder der entsprechenden Sedimente.

Auch Färbungen mit Karminessigsäure ergaben kein brauchbares Resultat.

Feulgensche Nuklealreaktion: Unfixierte oder fixierte Ausstriche wurden 5 Minuten in 1 n HCl bei 60° C hydrolysiert, kurz in Wasser getaucht, 60 Minuten in fuchsinschweflige Säure gelegt, dreimal je 2 Minuten in SO₂-haltigem Wasser gewaschen, kurz in Brunnenwasser getaucht und in Glyzeringelatine eingeschlossen. Als Kontrolle wurden andere Ausstriche ohne Hydrolyse gefärbt. Das Kernmaterial erschien deutlich rot, doch waren die Verluste an ausgestrichenem Material infolge der für diese Reaktion notwendigen Behandlung sehr groß. Vor allem die Hydrolyse mit Salzsäure erwies sich als verheerend für die kleinen Zytoplasmakomponenten, so daß hydrolysierte und unhydrolysierte Präparate nicht mehr quantitativ vergleichbar waren.

Zusammenfassend kann gesagt werden, daß die Versuche mit Hellfeldfärbungen keine befriedigende Kontrollmethode für Zellhomogenate ergaben.

22.3 Färbungen mit Fluorochromen

Die Fluorochromierung besitzt den großen Vorteil, daß die Zellkomponenten auch aus Lösungen sehr niedriger Konzentration genügend Farbstoff anzureichern vermögen, um bei Bestrahlung mit gefiltertem UV-Licht stark zu fluoreszieren. Die Eigenfluoreszenz der Farblösungen ist in mikroskopisch dünner Schicht so gering, daß sie die Beobachtung der fluoreszierenden Zellpartikel nicht stört. Das Auswaschen der überschüssigen Farblösung erübrigt sich also.

An lebenden Zwiebelhäutchen (obere Epidermis der Zwiebelschuppen) wurden verschiedene Fluorochrome auf ihre Brauchbarkeit geprüft.

Zu vergleichenden Untersuchungen wurden etwa 5×5 mm große Häutchen der gleichen Schuppenzone 15 bis 30 Minuten lang in Farblösung 1:10000 gelegt. Die Farbstoffe waren in destilliertem Wasser, das 10 % Rohrzucker (RZ) enthielt, gelöst (pH 5,5). Diese Konzentration entsprach ungefähr dem osmotischen Wert der Epidermiszellen. Um die Farblösung besser eindringen zu lassen, wurden die Färbegefäße mit den Häutchen evakuiert. Hierauf wurden die Häutchen in frische RZ-Lösung gebracht und sofort mikroskopiert.

Leitz-Fluoreszenzmikroskop mit Hg-Brenner: Philips CS 150; Filter: 3 %ige CuSO_4 -Lösung, 13 mm + UG 1, 2 + 4 mm; Sperrfilter: Euphos (+ evtl. OG 1).

Zeiß-Fluoreszenzmikroskop mit Hg-Brenner: Osram HB 200; Filter: 3 %ige CuSO_4 -Lösung, 40 mm + UG 2, 2 mm + UG 5, 2 mm; Sperrfilter: Euphos (+ evtl. OG 1).

Tabelle 1

| <i>Basische Fluorochrome:</i> | | | <i>Zellwand</i> | <i>Zellkern</i> | | <i>Zytoplasma</i> | |
|-------------------------------|---------------------|-------------------|-----------------|-------------------------------------|-------|------------------------------|-------|
| I | Coriphosphin O | orange | ++++ | grün, orange (Nukleolen ++++) | +++ | grün, orange | ++ |
| II | Berberinsulfat | grünlichgelb | ++++ | grünlichgelb | +++ | grünlichgelb | ++ |
| <i>Saure Fluorochrome:</i> | | | | | | | |
| III | Thioflavin T | hell bläulichgrün | +++ | blaugrün (Nukleolen ocker++) | +(+) | hellblau | |
| IV | Kalium-Fluorescein | — | | gelbgrün bis olivgrün | +++ | gelbgrün | +++ |
| | Eosin gelblich | — | | olivgrün | ++(+) | gelbgrün bis ockergelb | ++(+) |
| | Erythrosin gelblich | — | | olivgrün | ++ | gelbgrün bis bläulichgrün | ++ |

+, ++, +++, +++++ relative Fluoreszenz-Intensität.

In Tabelle 1 sind die Fluorochrome zusammengestellt, die eine saubere Kernfärbung ergaben. Die Acridin-Farbstoffe (Coriphosphin und Acridin-Orange) waren hinsichtlich Unterscheidbarkeit von Zellkernen, Zellwänden und Zytoplasma am geeignetsten. In Anlehnung an Haitinger (1938) wurde schließlich Coriphosphin O vorgezogen.

Wünschenswert wäre eine eindeutige färberische Differenzierung zwischen Kern- und Zytoplasmamaterial, da in den Zellhomogenaten kleine Kerntrümmer vorkommen, die sich nur auf Grund ihrer Form nicht als solche identifizieren lassen. Nach Haitinger (1938) soll eine Doppelfärbung mit Coriphosphin und Fuchsin oder Kongorot Zellkern und Zytoplasma differenziert darstellen. Ich wiederholte diese Versuche ohne befriedigende Resultate.

Entscheidend für die Brauchbarkeit der Coriphosphin-Färbung war, ob sich auch für Zellhomogenate und Zellkernsedimente Bedingungen finden ließen, die eine differenzierte Färbung der einzelnen Komponenten erlauben würden.

Auf dem Objektträger etwa zwei Teile der zu untersuchenden Suspension mit einem Teil Farblösung (Coriphosphin O 1:10⁴ in 0,3 m RZ) versetzen, 20 Minuten ohne Deckglas in feuchter Kammer färben. (Ohne feuchte Kammer kristallisiert der Farbstoff aus, was die mikroskopische Kontrolle stört.)

Wenn Kerne in wäßrigen Medien, die 0,3 m (10%) RZ enthielten, isoliert und suspendiert worden waren, so nahmen sie mit Coriphosphin – genau wie Zytoplasma und Zellwände in solchen Medien – eine tief orange Farbe an, alles schien mehr oder weniger gleich intensiv zu fluoreszieren. Es war in diesem Falle zweckmäßig, die Farbkonzentration zwei- bis dreimal zu erniedrigen: Die Kerne zeigten dann schmutziggelbe Fluoreszenz und ließen auch ihre Innenstruktur durchscheinen, so daß sie meist eindeutig von anderem Material unterschieden werden konnten. Je mehr die RZ-Konzentration der Medien für die Aufarbeitung der Kerne erhöht wurde, desto besser gelang eine Fluoreszenzdifferenzierung in dem Sinne, daß sich das Kernmaterial durch intensiv grüne Farbe vom übrigen Zellmaterial unterschied. Bei 55 (Dichte 1,25) oder mehr Gewichtsprozenten RZ fluoreszierten die Kerne und Kerntrümmer meist schwach grün bis leuchtend hellgrün (Nukleolen hellgrün oder orange). Die Plasmapartikel fluoreszierten orange. Die größte Variationsbreite in der Fluoreszenzfarbe wiesen die Zellwände auf: schwach ockerfarben, schmutziggrün und der Hauptanteil mehr oder weniger stark orange. Intensiv hellgrün wie die Kerne oder gelbgrün fluoreszierten oft die Spiralen der Tracheiden, was anfänglich eine Verwechslung von Kernstriemen mit Spiralfragmenten zuließ. Eine Kontrolle war in polarisiertem Licht möglich, das die Spiralen infolge ihrer Doppelbrechung aufleuchten läßt. Stärkekörner – wenn vorhanden – fluoreszierten nur schwach, und zwar hellblau bis blaugrün. Sie werden also von Coriphosphin kaum fluorochromiert und sind nach Fluoreszenzfarbe und -intensität keinesfalls mit Kernen zu verwechseln.

Da schließlich für alle Versuche konzentrierte RZ-Lösungen verwendet wurden, erwies sich die Fluorochromierung mit Coriphosphin als sehr geeignet zur Routinekontrolle des Reinheitsgrades der Kernsedimente.

23 Quantitative Erfassung des Zellkernanteiles

23.1 *Klassifizierung der Sedimentskomponenten*

Die Suspensionen der Zellkernsedimente wurden mikroskopisch nach folgenden Kategorien ausgezählt:

1. intakte Kerne
2. leicht beschädigte Kerne
3. Kerntrümmer (\pm isodiametrisch)
4. zu Striemen ausgezogene Kerne oder Kerntrümmer

5. «kleine Teilchen»: Zytoplasmateilchen sowie alle Teilchen, die kleiner als 2μ waren und nicht identifiziert werden konnten
6. Zellwände (und evtl. Stärke)

Am sichersten war die Analyse auf Grund des Fluoreszenzbildes mit seiner differenzierten Färbung der verschiedenen Zellkomponenten.

23.2 Prinzip des Integrationsokulares und Auswertung der Ergebnisse

Zur Bestimmung des relativen Anteiles von Zellkern-, Zytoplasma- und Zellwandmaterial im mikroskopischen Präparat eines Homogenates oder Kernsedimentes wurde das *Zeiß-Integrationsokular I* (Kpl $8 \times$) mit *Testpunktplatte* (25 Testpunkte) verwendet (Hennig, 1957 und 1958).

Beliebig eingestellte Gesichtsfelder wurden in der Weise ausgezählt, daß jede Berührung eines Testpunktes mit einem Teilchen als Treffer notiert wurde. Wenn viele Gesichtsfelder ausgezählt werden, ist die Treffersumme für eine bestimmte Kategorie proportional ihrem Flächenanteil an der getesteten Gesamtfläche.

Die im folgenden für eine bestimmte Kategorie angegebenen Zahlen bedeuten den Mittelwert einer Serie von Zählungen sowie die mittlere quadratische Abweichung von diesem Mittelwert (Standardabweichung), welche durch folgende Beziehung gegeben ist:

$$\sigma = \pm \sqrt{\frac{K(100-K)}{n}} \%$$

| | |
|-------|---|
| K | Trefferanteil in Prozenten für eine bestimmte Kategorie |
| 100-K | Trefferanteil in Prozenten für alle übrigen Kategorien zusammen |
| n | Anzahl aller Treffer |

Diese Abweichung ist ein Maß für den durch die Zufallstheorie bedingten Versuchsfehler. Sie kann – wenn entsprechend viele Auszählungen vorgenommen werden – unter einer beliebig niedrigen Grenze gehalten werden. Um für eine Kategorie, die z. B. 40 oder 60 % der Treffer umfaßte, die Abweichung nicht größer als 2 bis 3 % werden zu lassen, mußten etwa 120 Gesichtsfelder getestet werden; denn pro Gesichtsfeld wurden meist 2 bis 5 Treffer gezählt (was bedeutet, daß 10 bis 20 % der Gesichtsfeldfläche mit Teilchen bedeckt war). Von einer zu prüfenden Probe wurden jeweils 4 Präparate hergestellt und von diesen je 30 zufällig eingestellte Gesichtsfelder ausgezählt. Nach einiger Übung erforderte das Testen von 120 Gesichtsfeldern nicht mehr als $1 \frac{1}{2}$ Stunden.

Zu der durch die Zufallstheorie bedingten Abweichung tritt noch eine, die durch den Beobachtungsfehler verursacht wird: $\sigma_{beob.}$.

Somit wird
$$\sigma_{total} = \sqrt{\sigma_{theoret.}^2 + \sigma_{beob.}^2}$$

Der Beobachtungsfehler ist aber sehr klein, weil ja keine Zahlenwerte abgelesen, sondern bloß Treffer festgestellt werden müssen, wobei sich die fluoreszierenden Treffer vom dunklen Hintergrund deutlich abheben. Wird als Wahrscheinlichkeit, daß ein Testpunkt falsch bewertet wird, der (hohe) Wert $1/20$ angenommen, so resultiert für 2500 Testpunkte (100 Gesichtsfelder) ein Beobachtungsfehler von $1/20 : \sqrt{2500} = 0,1\%$. Die durch den Beobachtungsfehler bedingte Abweichung darf somit vernachlässigt werden.

Um zu prüfen, ob zwischen zwei unter verschiedenen Versuchsbedingungen hergestellten Sedimenten ein gesicherter Unterschied hinsichtlich des Trefferanteils für die einzelnen Kategorien bestehe, wurde der χ^2 -Test angewandt (Linder, 1951, S. 204, und Tafel für χ^2).

Tabelle 2
 χ^2 -Test

| Teilchenkategorie | Trefferzahlen | | | |
|-------------------|------------------|-------|---|--------------------------------------|
| | Versuchsergebnis | | theoretisch, wenn A' und A'' der gleichen Grundgesamtheit angehören | |
| | A' | A'' | A' | A'' |
| 1-4 | a' | a'' | $a' = \frac{a' + a''}{N} \cdot n'$ | $a'' = \frac{a' + a''}{N} \cdot n''$ |
| 5 | b' | b'' | β' | β'' |
| 6 | c' | c'' | γ' | γ'' |

$$n' = a' + b' + c', n'' = a'' + b'' + c'', N = n' + n''$$

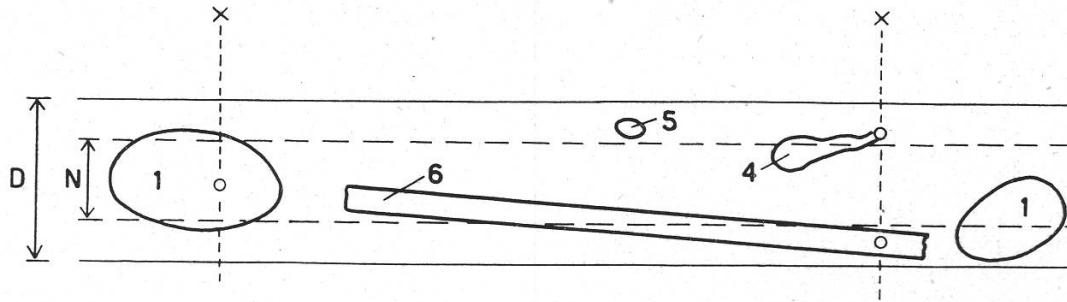
$$\chi^2 = \frac{(a' - a')^2}{a'} + \frac{(a'' - a'')^2}{a''} + \frac{(b' - \beta')^2}{\beta'} + \frac{(b'' - \beta'')^2}{\beta''} + \frac{(c' - \gamma')^2}{\gamma'} + \frac{(c'' - \gamma'')^2}{\gamma''}$$

Freiheitsgrad $n = 2$

Die Ergebnisse für A' und A'' wurden dann als signifikant verschieden interpretiert, wenn $\chi^2 \geq 3,841$; die Wahrscheinlichkeit P, daß A' und A'' der gleichen Grundgesamtheit angehören, ist dann: $P \leq 0,05$. (Als Maß für die Sicherheit des Unterschiedes zweier Ergebnisse wird in den Resultattabellen die Größenordnung von P jeweils angegeben.)

23.3 Volumenkorrektur

Die Trefferzahlen für die nach Form und Größe verschiedenen Zellkomponenten wären deren relativem Volumenanteil nur dann in guter Annäherung gleich, wenn der Tiefenbereich der Sichtbarkeit der Teilchen im Vergleich zu deren Dicke gering wäre (etwa 1:10). Dieser Bereich ist aber in unserem Falle so groß oder größer als die Dicke der Teilchen (vgl. Fig. 3). Somit besteht hier keine direkte Beziehung zwischen Trefferzahlen und Volumenanteil.



Figur 3

Auszählung der Teilchen im Mikroskop

| | | | |
|---|---|---|--------------------|
| x | Testpunkt | 1 | intakte Zellkerne |
| o | Treffer (es wird fokussiert) | 4 | Zellkernstriemen |
| D | Präparatdicke | 5 | «kleines Teilchen» |
| N | Tiefenbereich der Sichtbarkeit der Teilchen | 6 | Zellwandstück |

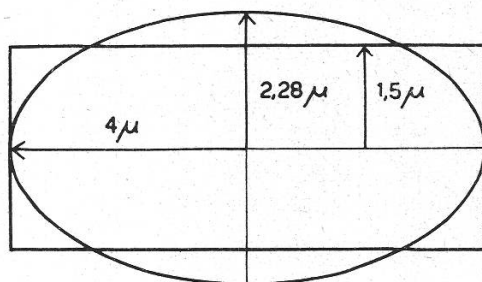
Dieser Schwierigkeit wurde wie folgt begegnet: In den nach Zufall eingestellten Gesichtsfeldern wurden die Treffer durch die ganze Tiefe des Präparates hin gesucht. Ohne solche Fokussierung wäre die Trefferausbeute vom Tiefenbereich der Sichtbarkeit abhängig, wobei für stärker fluoreszierende Teilchen die Wahrscheinlichkeit, entdeckt zu werden, größer wäre, so daß das Ergebnis einseitig beeinflußt werden könnte. Um aus dem Trefferverhältnis der Zellkomponenten ihr Volumenverhältnis zu erhalten, mußte jenes entsprechend der verschiedenen Form und Größe der einzelnen Komponenten korrigiert werden. Die so erhaltenen Volumenanteile entsprechen allerdings nur angenäherten Werten.

An frischen, fluorochromierten Handschnitten (in 10%iger, d. h. «isoton.» RZ-Lösung) von verschiedenen Wurzelzonen wurde die Kernform untersucht (an Längs- und Querschnitten). Zufallsserien von Kernen gelangten mit dem Mikrometerokular zur Ausmessung (großer und kleiner Durchmesser). Durch Auszählen mit einem Netzokular wurde in verschiedenen Wurzelzonen die Anzahl Kerne pro Zählfläche ermittelt und durch Wägen der Volumenanteil der untersuchten Zonen am Gesamtvolumen der Wurzeln festgestellt.

In der Teilungszone der Wurzelspitzen waren die Kerne mehr oder weniger kugelig, in der Streckungszone aber bereits leicht abgeplattet.

Die Abplattung (symmetrisch oder asymmetrisch) wurde mit zunehmendem Alter der Zellen ausgeprägter. Wo sich der Zentralzylinder herausbildete, waren auch Kerne zu beobachten, die eine längliche, wurstartige Form angenommen hatten.

Als durchschnittliche, leicht zu berechnende Kernform wurde nun – unter Berücksichtigung der erwähnten Messungen und Zählungen – ein Rotationsellipsoid mit der Rotationsachse a und dem Durchmesser $1,75 a$ gewählt. Nach Messungen an isolierten Kernen wurden für den Durchmesser 8μ angenommen (siehe 24.31). An Stelle des Rotationsellipsoides wurde der Berechnung ein Zylinder mit der Grundfläche $(4 \mu)^2 \cdot \pi$ und der Höhe 3μ zugrunde gelegt (Fig. 4); das Volumen wird so um $1,5\%$ kleiner.



Figur 4

Berechnung des Zellkernvolumens (Näherung)

$$\begin{aligned} \text{Volumen des Rotationsellipsoides} &= \pi \cdot (4)^2 \cdot 2,28 \cdot \frac{4}{3} \\ \text{Volumen des Zylinders} &= \pi \cdot (4)^2 \cdot 3 \end{aligned}$$

Die Dicke der Zellwände wurde mit dem Mikrometerokular an den gleichen Handschnitten gemessen. In der Vegetationsspitze betrug der Abstand benachbarter Protoplasten rund $0,5 \mu$; in den hinteren Wurzelzonen steigerte sich diese Strecke – das heißt die Dicke zweier benachbarter Zellwände mit dazwischenliegender Mittellamelle – bis auf 2μ (evtl. bis auf $2,5 \mu$). Da während der mechanischen Homogenisierung die Zellwände durch die Mittellamelle verbunden bleiben, mußte für die durchschnittliche Dicke der unter Kat. 6 rubrizierten «Wände» ein genügend hoher Wert, nämlich 2μ , angenommen werden.

Die Dicke der Kerntrümmer (Kat. 3) und der Kernstriemen (Kat. 4) wurde mit 2μ , diejenige der «kleinen Teilchen» (Kat. 5) mit 1μ bewertet. Dies sind bloß grobe Abschätzungen, da sich keine Möglichkeit ergab, die Dicke dieser Teilchen direkt zu messen.

Der Korrekturfaktor für die Trefferanteile war nun durch die relative Teilchendicke der betreffenden Kategorien gegeben. Als Beispiel sei die Korrektur der Trefferzahlen eines Kernsedimentes angeführt¹:

¹ In den folgenden Resultattabellen sind die Trefferanteile mit ihren Standardabweichungen angeführt. Eventuell sind die berechneten Volumenanteile in Klammern dazugesetzt.

| | | Treffer % | | rel. Dicke | | Volumenterteile | Volumen-% |
|------|-----|-----------|---|------------|---|-----------------|-----------|
| Kat. | 1+2 | 23 | × | 3 | = | 69 | 31,5 |
| | 3+4 | 21 | × | 2 | = | 42 | 19 |
| | 1-4 | 44 | | | | 111 | 50,5 |
| | 5 | 4 | × | 1 | = | 4 | 2 |
| | 6 | 52 | × | 2 | = | 104 | 47,5 |
| | | | | | | 219 | |

24 Medium

24.1 Allgemeines

In Tabelle 3 sind neuere Arbeiten über Zellkernisolierung in wäßrigen Medien zusammengestellt. Drei Typen von Medien wurden immer wieder verwendet:

1. verdünnte Zitronensäure
2. RZ-Lösung verschiedener Konzentration, mit oder ohne Salzzusatz
3. Glycerinlösung verschiedener Konzentration

Seltener gelangten Lösungen von Gummi arabicum (Dounce, 1955) oder Äthylen-Glykol (Mazia, 1952) zur Anwendung.

Während meiner Versuche stellte sich heraus – in Übereinstimmung mit Johnston et al. (1957), welche dichte RZ-Lösungen gebrauchten –, daß die Kernmorphologie in dichten RZ-Medien während des Homogenisierens und Zentrifugierens viel besser erhalten blieb als in verdünnten RZ-Lösungen (relativ mehr Kerne der Kat. 1 und 2). Schließlich arbeitete ich immer mit konzentrierten RZ-Lösungen (Dichte rund 1,3)¹.

Glycerin war weniger günstig, weil seine Dichte nur 1,25 beträgt und weil es in hohen Konzentrationen (90% und mehr) eine enorme Viskosität aufweist, welche beim Zentrifugieren hinderlich war.

Das pH der RZ-Lösungen (destilliertes Wasser) betrug 5,5. Auf Pufferung wurde verzichtet, weil Phosphat- und andere Ionen die Agglutination der Zellkomponenten im Homogenat stark fördern (Hogeboom und Schneider, 1955; Dounce, 1955).

24.2 Substanzverlust der Kerne im Medium

Große Beachtung muß der Löslichkeit von Kernsubstanz in wäßrigen Medien geschenkt werden. Wasserlöslich sind Bestandteile der Karyolymphe, wie freie Ribonukleotide, niedrig polymere RNS, ATP; ferner Kom-

¹ Saccharose puriss. pro injectione (pyrogenfrei). Zur Vermeidung von Infektionen wurden den Lösungen einige Tropfen Chloroform zugesetzt.

Tabelle 3

Homogenisierungstechnik für Zellkern-Isolierung in wäßrigem Milieu

| <i>Autor</i> | <i>Medium</i> | <i>Homogenisator</i> | <i>Zentrifugiertechnik</i> |
|---|--|-------------------------|--|
| A. Tierische Gewebe (meist Rattenleber) | | | |
| 1. Schneider und Petermann (1950) | 0,25 m RZ + 0,0018 CaCl ₂ | Mixer | Schichtentechnik |
| 2. Schneider (1955) | 70% Glycerin | Glaskolben | Schichtentechnik |
| 3. Anderson und Wilbur (1952) | 0,145–0,88 m RZ + etwa 0,01 m Phosphatpuffer, pH 7,1 | Glaskolben | Schichtentechnik |
| 4. Hogeboom et al. (1952) | 0,25 m und 0,34 m RZ + 0,0018 m CaCl ₂ | Plastikkolben | Schichtentechnik |
| 5. Lang und Siebert (1952) | 30% RZ | rotierender Stahlkolben | |
| 6. Dallam (1955) | 75% Glycerin | Pottier-Kolben | dichtes Medium (95% Glyz., d = 1,24) |
| 7. Smellie et al. (1955) | 0,05 m Zitronensäure | Plastikkolben | |
| 8. Dounce et al. (1955) | a) 0,44 m RZ, mit Zitronensäure auf pH 6 eingest. b) 0,44 m RZ + 0,005 m CaCl ₂ | Plastikkolben | |
| 9. Philpot und Stanier (1956) | 0,3 m RZ + 0,065 m K-Glyzerophosphat + 0,001 m MgCl ₂ + 40% Glycerin, pH 7 (Dichte etwa 1,14) | konischer Stahlkolben | Schichtentechnik |
| 10. Chauveau et al. (1956) | 2,2 m RZ (d = 1,28) | Plastikkolben | dichtes Medium (RZ, d = 1,28), Ultrazentrifuge |
| 11. Albright und Anderson (1958) | 0,25 m RZ + 0,0001 m CaCl ₂ | | Dichtegradient mit RZ-Lösung (d = 1,03–1,17) |
| B. Pflanzliche Gewebe | | | |
| 12. Johnston et al. (1957) | 2 m RZ + 0,01 m CaCl ₂ | Mixer | dichtes Medium (RZ gesättigt, d = 1,32), Ultrazentrifuge |
| 13. Johnston und Setterfield (1959) | | | |

ponenten des Kernproteins, z. B. ein Teil des Globulins und evtl. gewisse Enzyme.

Zuckerlösungen üben im Gegensatz zu Salzlösungen keine spezifischen Wirkungen auf Proteine und Nukleinsäuren aus (Lösung, Fällung, Spaltung der Nukleoproteide usw.), sondern verhalten sich indifferent wie destilliertes Wasser, mit dem willkommenen Unterschied, daß bei steigender Zuckerkonzentration die Löslichkeit für Proteine und Nukleinsäuren stark abnimmt. Ferner ist in konzentrierten, viskosen Zuckerlösungen die Diffusions- und damit auch die Lösungsgeschwindigkeit stark herabgesetzt. Beides bewirkt, daß die Kerne in konzentrierten RZ-Lösungen (Dichte etwa 1,3) viel langsamer Substanz verlieren als in verdünnten Lösungen oder in destilliertem Wasser.

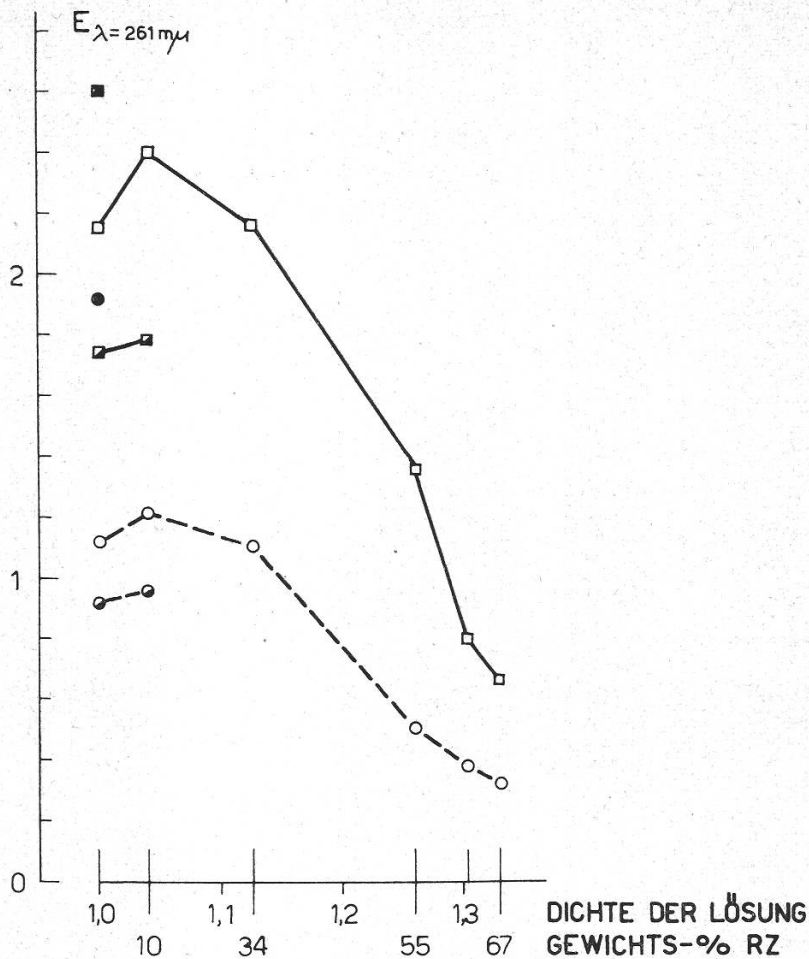
Um die Lösungsgeschwindigkeit von RNS in hoch konzentrierten RZ-Lösungen zu prüfen, wurden Modellversuche durchgeführt:

Je 10 mg Hefe-RNS-Trockenpulver¹ wurden in 100 ml vorgekühlte Lösung von RZ puriss. verschiedener Konzentration mit oder ohne Zusatz von 0,002 *m* CaCl₂ gebracht und 5 Stunden bei 4° C stehen gelassen. (Temperatur und Zeit entsprachen den beim Aufbereiten der Kernsedimente herrschenden Bedingungen.) Jede Stunde wurden die Gefäße kräftig umgeschüttelt. Hernach wurde durch säuregewaschenes Filtrierpapier oder durch Watte filtriert und die UV-Absorption der Filtrate im Beckman-Photometer DU gemessen. Das Absorptionsmaximum der verwendeten Hefe-RNS lag bei $\lambda = 261 \text{ m}\mu$.

Die Resultate sind in Figur 5 dargestellt. In den nahezu gesättigten RZ-Lösungen wurden innerhalb der Versuchszeit rund dreimal weniger RNS gelöst als in den niedrig konzentrierten Lösungen. Bei Zusatz von 0,002 *m* CaCl₂ war die gelöste Menge RNS bei gleicher Dichte des Mediums noch zweimal kleiner. Wurde das Schütteln unterlassen, sank die gelöste RNS-Menge um 20%, was auf schlechte Durchdringbarkeit des verwendeten Pulvers hinweist. Unerklärlich ist der Anstieg der gelösten RNS-Menge in 10%iger RZ-Lösung gegenüber destilliertem Wasser.

Zellkerne in Medien niedriger RZ-Konzentration (10%, 30%) oder in destilliertem Wasser zeigten nach 2 Stunden je nach Konzentration des Mediums einen mehr oder weniger deutlichen Massenschwund und oft einen eckigen, unregelmäßigen Umriß. Der Massenverlust äußerte sich darin, daß solche Kerne nach Fluorochromierung eine viel schwächere Fluoreszenz aufwiesen als Kerne in frischen Wurzelschnitten oder in konzentrierten RZ-Medien; ihr Rand fluoreszierte viel stärker als das Innere, wie wenn sie bloß noch mehr oder weniger leere Hüllen darstellten. Es kam auch vor, daß die Kernmembran eine oder auch zwei bis drei bläschenartige Ausstülpungen aufwies. (Auch Anderson und Wilbur, 1952, und Anderson, 1953a, beobachteten an Rattenleberkernen in

¹ Brit. Drug Houses, London; Labor. Reag. Das Pulver enthält neben RNS auch Protein und evtl. andere Beimengungen.



Figur 5

Löslichkeit von Hefe-RNS in RZ-Medien verschiedener Konzentration

10 mg RNS-Pulver auf 100 ml RZ-Medium

□—□ RZ puriss.

○—○ RZ puriss. + 0,002 m CaCl₂

■ ● 1 1/2 Stunden bei 55° C + 3 1/2 Stunden bei 20° C

□ ○ 4 Stunden bei 4° C, jede Stunde einmal kräftig umgeschüttelt

■ ● 4 Stunden bei 4° C, nicht umgeschüttelt

Mittel aus 3 Versuchen

destilliertem Wasser oder reiner RZ-Lösung [etwa 0,3 m] Bläschen in der Kernmembran.) Hingegen war an Kernen in dichten RZ-Medien (Dichte etwa 1,3) noch nach 24 Stunden (aufbewahrt bei 2 bis 4° C) nichts zu beobachten, was auf Massenverlust hätte schließen lassen: Größe, Innenstruktur, und Fluoreszenzintensität waren ungefähr gleich geblieben. In so dichtem Medium in mikroskopischen Präparaten eingeschlossene Kerne zeigten nach zwei Tagen keine auffälligen Veränderungen: Der viskose Zuckersirup wirkte gleichsam als Einschluß- und «Fixiermittel»!

24.3 Wirkung von 0,002 m CaCl₂

Viele Autoren setzten dem Medium geringe Mengen CaCl₂ zu (siehe Tab. 3). Die Angaben über die Wirkung solcher Zusätze stimmen nicht immer überein. Ich versuchte daher, den Einfluß von 0,002 m CaCl₂ auf Kerngröße, Kernaussbeute usw. abzuklären.

24.31 CaCl₂ und Zellkerngröße

Zellkerne in Schnitten von Zwiebelwurzeln (siehe 23.3) und Kerne, die in RZ-Medien mit oder ohne CaCl₂ isoliert worden waren (nach 27), wurden mit dem Mikrometerokular ausgemessen. Die Zahlen für den mittleren Zellkerndurchmesser sind in Tabelle 4 wiedergegeben. Es bedeuten:

| | | |
|----|---|--|
| W | Zellkerne in Wurzelschnitten (in isoton. RZ-Lösung) | |
| | Zellkerne isoliert: | |
| | Medium für Homogenisation | Medium für Zentrifugieren und Aufbewahrung |
| A | RZ puriss. | RZ puriss. |
| B | RZ puriss. | RZ puriss. +0,002 m CaCl ₂ |
| C | RZ puriss. +0,002 m CaCl ₂ | RZ puriss. |
| D | RZ puriss. +0,002 m CaCl ₂ | RZ puriss. +0,002 m CaCl ₂ |
| | Dichte des Homogenates 1,26 | Dichte der Suspension 1,3 |
| I | Messung in der 3. bis 5. Stunde nach dem Zentrifugieren | |
| II | Sediment 2 Tage bei 2° C aufbewahrt | |

Wo zwischen zwei Mittelwerten ein statistisch gesicherter Unterschied besteht, sind die Zahlen unterstrichen. Die Prüfung erfolgte mit Hilfe der *t*-Verteilung (Linder 1951, S. 159, und *t*-Tafel). Der Vergleich der Zahlen zeigt, daß in reinem konzentriertem RZ (pH 5,5) isolierte Kerne gegenüber Kernen in lebenden Geweben eine beträchtliche Schrumpfung aufwiesen – etwa 30% des Durchmessers.

Im Gegensatz zu diesen Feststellungen sollen nach Anderson und Wilbur (1952) in auf pH 7,1 gepufferter RZ-Lösung (0,25 bis 0,88 m) isolierte Rattenleberkerne sich ähnlich wie in destilliertem Wasser verhalten: Sie quellen und bersten zum Teil. Nach Albert und Felix (1955) schwellen Kerne aus Ganglien- und Gliazellen bei längerem Verweilen in reiner 40%iger RZ-Lösung (oder geringere Konzentration) an.

Enthielt das Medium zusätzlich CaCl₂, so schrumpften die Kerne gegenüber jenen in RZ ohne CaCl₂ innerhalb der ersten fünf Stunden nochmals um 10% (die Kerne erschienen im Fluoreszenz- und Phasenkontrast-

Tabelle 4
Mittlerer Zellkerndurchmesser in μ

| Zellkerne in Wurzelschnitten | W 11,50 ± 3,14 | | | | W:A 1,45 P < 0,001 |
|---------------------------------|--|-------------|------------------|-------------|---|
| Zellkerne isoliert | A | B | C | D | |
| I | 7,90 ± 1,41 | 7,52 ± 1,43 | 7,62 ± 1,55 | 7,13 ± 1,08 | |
| II | 7,63 ± 1,15 | 7,25 ± 1,32 | 6,84 ± 1,46 | 6,45 ± 0,95 | |
| I:II | 1,03 | 1,04 | 1,11 | 1,10 | |
| | | | 0,01 > P > 0,001 | | P < 0,001 |
| I | A : B : C : D 1,11 : 1,05 : 1,07 : 1,00 | | | | A:D P < 0,001 |
| II | 1,18 : 1,12 : 1,06 : 1,00 | | | | A:C A:D B:D 0,01 > P > 0,001 P < 0,001 P < 0,001 |

Zahlen: mittlerer Durchmesser von je 58 (für A, B, C, D) bzw. 79 (für W) Zellkerne mit Standardabweichung.

$$\bar{x} = \frac{1}{N} \cdot \sum_{i=1}^N \frac{d'_i + d''_i}{2} \quad \begin{array}{l} d' = \text{größter Kerndurchmesser} \\ d'' = \text{kleinster Kerndurchmesser} \end{array}$$

$$s = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N (x_i - \bar{x})^2}{N-1}}$$

mikroskop sehr «dicht») und innerhalb zweier Tage um 20%, während die Kerne im reinen RZ-Medium nach zwei Tagen kaum stärker geschrumpft waren als unmittelbar nach der Isolierung. In drei weiteren Versuchen ergab sich in Medium D innerhalb der ersten drei Stunden nach der Isolierung stets eine Schrumpfung von 10% gegenüber Medium A.

Wilbur und Anderson (1951) und Anderson und Wilbur (1952) beobachteten bei Zugabe von 0,001 bis 0,0015 CaCl₂ (oder MgCl₂) eine deutliche Schrumpfung und Granulierung der Rattenleber-Zellkerne. (Die Kerne erschienen im Phasenkontrastmikroskop sehr «dicht».) Vorbehandlung mit Desoxyribonuklease verhinderte aber diese charakteristischen Volumenänderungen.

24.32 CaCl₂ und Zellkernaussbeute

Bei Zusatz von 0,002 m CaCl₂ zum Medium fielen beim Zentrifugieren voluminösere Sedimente an. Die Kontrolle von Suspensionen solcher

Sedimente ergab jeweils, daß sie bedeutend mehr Partikel enthielten (bis viermal mehr) als Suspensionen von Sedimenten, die in CaCl_2 -freiem Medium hergestellt worden waren. Sie enthielten nicht nur mehr Kernmaterial aller Kategorien, sondern auch viel mehr kleinste Partikel und Zellwände. Diese «kleinen Partikel» (Kat. 5) waren nun meist mit kleineren und größeren Wandstücken und mit Kernmaterial zu eigentlichen «Nestern» agglomeriert – ähnlich solchen, wie ich sie nach Enzymbehandlung (25.2, Fig. 6) oder in alkoholischen (mindestens 30%) Medien beobachtete –, deren mikroskopische Zusammensetzung selten quantitativ bestimmt werden konnte. Die Zahlen in Tabelle 5 zeigen die Abhängigkeit des Auftretens solcher Agglomerate vom CaCl_2 -Gehalt des Mediums.

| | |
|------------|------------------------------------|
| A, B, C, D | wie unter 24.31 |
| K_1 | Kerne Kat. 1, 2, 3 (große Trümmer) |
| K_2 | Kerne Kat. 3 (kleine Trümmer), 4 |
| N | «Nester» (wie oben beschrieben) |

Die Zahlen bedeuten die Treffersumme aus je 120 zufälligen Gesichtsfeldern.

Tabelle 5

| | A | B | C | D |
|-------|----|----|----|-----|
| K_1 | 17 | 13 | 16 | 26 |
| K_2 | 9 | 16 | 16 | 21 |
| N | 1 | 25 | 68 | 126 |

Bei Zusatz von CaCl_2 erfolgte eine Häufung der «Nester». Nachteilig war nun, daß – wie eine genaue mikroskopische Kontrolle ergab – in solchen Agglomeraten neben kleinen Wandstücken und Kerntrümmern auch kleine Partikel eingeschlossen waren, die vermutlich aus dem Zytoplasma stammten. Dieses Zytoplasma wäre wegen seiner geringeren Dichte ohne solche Zusammenklumpung mit dichteren Wand- oder Kernteilchen gar nicht in so großer Menge ins Sediment gelangt.

Die starke Agglomeration der Zellpartikel bei Anwesenheit von CaCl_2 war auch makroskopisch gut erkennbar: Nach dem Zentrifugieren war das über der unterschichteten RZ-Lösung stehende Homogenat bei A und B makroskopisch homogen milchig, das Homogenat bei C und D aber enthielt lauter kleine Flöckchen. Bei A und B zeigte sich nach dem Zentrifugieren an der Grenze zwischen Homogenat und Unterschichtetem ein «Kranz» feinstflockigen Materials, dessen Dichte kleiner als die der unterschichteten RZ-Lösung ($d=1,3$) sein mußte. Solche «Kränze» enthielten feinste, schwach fluoreszierende Teilchen (evtl. Zytoplasma), feinste Zell-

wandfetzchen (siehe Figur 6) und auch – zerstreut – Kernmaterial, vor allem Kat. 3 und 4.

Die absolute Menge an Kernmaterial war bei CaCl_2 -Zusatz größer, vor allem die Menge der Kerntrümmer und Kernstriemen, was damit zusammenhängt, daß solche Kernteilchen nun – mit anderem Material zusammen – zu relativ großen Klumpen gepackt – leichter sedimentierten.

Johnston et al. (1957) erhielten in einem 2-*m*-RZ-Medium bei Zusatz von 0,001 oder 0,01 *m* CaCl_2 eine viel höhere Zellkernausbeute (Zellkerne aus Weizenembryonen), was sie so interpretieren, daß die Kerne bei CaCl_2 -Zusatz seltener bersten (auch andere Autoren sind dieser Ansicht, vgl. 24.33); aber nach der Beschreibung des Versuches könnte dafür eine ähnliche Zusammenballung wie in meinen Versuchen verantwortlich sein.

Anderson (1955a) erwähnt in bezug auf Rattenleber-Zellkerne, daß in reiner RZ-Lösung hergestellte Zellkernsedimente weniger mit «ganzen Zellen» verunreinigt waren als solche, die in RZ + 0,0018 *m* CaCl_2 oder in Lockes-Lösung mit oder ohne CaCl_2 hergestellt worden waren.

24.33 CaCl_2 und Erhaltung der Zellkerne

Wenn ungereinigte Hefe-RNS in wäßriger RZ-Lösung im Verhältnis 1:10⁵ suspendiert wird, so geht bei Zusatz von 0,002 *m* CaCl_2 in der gleichen Zeit 30 bis 50% weniger RNS in Lösung als in reiner Zuckerlösung (Fig. 3). Eine Erklärung für diese Tatsache ist vielleicht in der Richtung zu suchen, daß das Ca^{++} -Ion als Vernetzungsbrücke zwischen freien Carboxylgruppen verschiedener RNS-Moleküle wirken könnte, wodurch die RNS-Löslichkeit reduziert würde. Ein Zusatz von 0,002 *m* CaCl_2 zum konzentrierten RZ-Medium verringert demnach die Gefahr des RNS-Verlustes während der Isolierung der Zellkerne.

Nach Dounce (1955) wird die Autolyse von Rattenleber-Zellkernen unter anderem durch Zusatz von CaCl_2 in geringer Konzentration beträchtlich erniedrigt. Ich verfüge über keine Resultate, aus denen das Ausmaß einer Autolyse der Zellkerne während ihrer Isolierung ersichtlich wäre. Jedoch ist nicht anzunehmen, daß innerhalb 3 bis 5 Stunden, in einem dichten, viskosen RZ-Medium, bei 5° C (dies alles sind Bedingungen, welche die Geschwindigkeit autolytischer Prozesse herabsetzen) ins Gewicht fallende Substanzverluste durch Autolyse auftreten. Als Hinweis dafür mag die mikroskopische Kontrolle gelten, nach der (vgl. 24.2) die Zellkerne noch nach 24 Stunden kein verändertes Aussehen zeigten.

Schneider und Petermann (1950) und diesen folgend Hogeboom et al. (1952) setzten dem Homogenisationsmedium («isotonische» RZ-Lösung, siehe Tab. 3) 0,0018 *m* CaCl_2 zur Erhaltung der Kernmorphologie bei. Aus der Analyse meines Zahlenmaterials ergab sich aber kein Hinweis

dafür, daß ein Zusatz von 0,002 *m* CaCl₂ zum hochkonzentrierten RZ-Medium die mechanische Schädigung von Zellkernen während des Homogenisierens und Zentrifugierens vermindert hätte.

Zusammengefaßt kann für 0,002 *m* CaCl₂ folgende Wirkung angegeben werden:

1. Die Zellkerne schrumpfen stärker als in reinem RZ-Medium.
2. Die Löslichkeit von (Hefe-) RNS wird herabgesetzt.
3. Die absolute Ausbeute an Zellkernmaterial wird größer; die relative Ausbeute aber (d.h. der Reinheitsgrad der Zellkernsedimente) wird nicht erhöht. Die Partikel des Homogenates tendieren zu agglomerieren, wobei in diese Klumpen auch Zytoplasma eingeschlossen wird und mit ins Zellkernsediment gelangt.

In Anbetracht dieser – hinsichtlich einer möglichen beträchtlichen Verunreinigung der Zellkernsedimente mit Zytoplasmamaterial – gefährlichen Zusammenballungen von Zellmaterial wurde für die Standardmethode auf CaCl₂-Zusatz verzichtet, wenn ein solcher auch eine größere absolute Ausbeute an Zellkernmaterial ergeben und überdies das Risiko, daß die Kerne während der Isolierung meßbare Mengen RNS verlieren, verringert hätte.

25 Homogenisation

25.1 Wirkung verschiedener Homogenisatoren

Die Freisetzung der Kerne aus tierischem und pflanzlichem Gewebe kann erfolgen durch: Zerstoßen der Gewebe im Mörser (evtl. mit Quarzsand), Zermahlen in der Bakterienmühle, in der Zellkernmühle (Lang und Siebert, 1952; Poort, 1957) oder im sogenannten Potter-Homogenisator sowie durch Zerschlagen im Mixer (z. B. Waring Blendor). Wenn in verdünnten Lösungen homogenisiert wird, ist die Scherwirkung von Mörser, Potter-Homogenisator oder ähnlichen Apparaten günstiger als die Schlagwirkung der rasch rotierenden Mixermesser, die viele Kerne zertrümmern oder zu länglichen Striemen ausziehen. Nach Jagendorf und Wildman (1954) bleiben im Mörser oder Potter-Homogenisator die Kerne im großen ganzen intakt, und die Chloroplasten werden deformiert, während der Blendor umgekehrt die Chloroplasten intakt erhält und die Kerne deformiert. In den neueren Arbeiten (vgl. Tab. 3) wurde daher der Mixer als Homogenisator meist durch einen Kolben ersetzt, der dicht in ein Rohr eingepaßt ist. Potter und Elvehjem (1936) verwendeten einen in ein Glasrohr eingeschliffenen, rotierenden Glaskolben mit matt geschliffenen Glasflächen. Später wurden auch Kolben mit glatten Glasflächen oder aus Plexiglas oder Gummi (z. B. Kamphausen und Morton,

1956) eingeführt und die rasche Rotation des Kolbens durch eine schonendere langsame Auf-und-ab-Bewegung im Rohr ersetzt. (Anderson, 1956, zeigte, daß die Auf-und-ab-Bewegung eine größere Scherkraft und dabei weniger Hitze und strukturzerstörende Reibung entwickelt als die Rotation.) Ein besonders schonender Homogenisator ist der von Dounce (1955), bei welchem der Kolben durch eine glatte Glaskugel ersetzt ist, so daß die Scherwirkung in einem bestimmten Zeitpunkt nur auf einem schmalen Kreisband stattfindet.

Ich versuchte mit dem Mörser und mit dem Dounce-Homogenisator die mit dem Messer in etwa 5 mm lange Stücke zerschnittenen Zwiebelwurzeln zu homogenisieren. Die entwickelten Scherkräfte waren jedoch zu klein, um die Zellwände genügend aufzuschließen. Die Homogenisation gelang um so weniger, je dichter und viskoser das Medium war. Wenn in gesättigter RZ-Lösung homogenisiert wurde, blieb die Kernaussbeute ganz unbefriedigend.

Geeigneter erwiesen sich die Homogenisatoren, die nach dem Prinzip eines Mixers arbeiten. Besser als der Waring Blendor und der Ultraturrax¹ bewährte sich der Bühler-Homogenisator², dessen arbeitender Teil ein rotierendes Kreuz von scharfen, sichelförmig gebogenen Klingen darstellt. Alle Versuche wurden in der Folge mit diesem Apparat durchgeführt.

Wie schon Johnston et al. (1957) feststellten, werden im Blendor viel weniger Kerne zerstört oder deformiert, wenn in dichtem Medium homogenisiert wird. Wurden die Wurzeln mit dem dreifachen Volumen gesättigter RZ-Lösung im Bühler-Homogenisator zerschlagen (die Dichte des Homogenates betrug dann rund 1,26), so war das Verhältnis von unversehrten Kernen zu Kerntrümmern und Kernstriemen nicht schlechter als in Homogenaten, die in verdünntem Medium mit dem Mörser oder dem Dounce-Homogenisator hergestellt worden waren, und überdies war die Kernaussbeute viel größer.

Es können nun für jedes Medium von bestimmter Dichte und Viskosität optimale Homogenisationsbedingungen (Tourenzahl und Zeitdauer) gesucht werden mit dem Ziele, daß:

1. der relative Zellkernanteil im Homogenat, das durch Filtrieren von Gewebestückchen und groben Zellwandtrümmern befreit worden ist, möglichst hoch ist;
2. die Ausbeute solcher Kernteilchen, bezogen auf die Menge der verarbeiteten Wurzeln, möglichst hoch ist;
3. der relative Anteil der intakten Kerne möglichst hoch ist.

¹ Fr. Meili, Zürich.

² Edmund Bühler, Tübingen.

Die Zahlen in Tabelle 6 zeigen, wie die Zusammensetzung der Kernsedimente stark von den Homogenisationsbedingungen abhängt.

Die vorzerkleinerten Wurzeln (etwa 5 mm) wurden mit dem dreifachen Volumen gekühlter, gesättigter RZ-Lösung homogenisiert, wobei das Gefäß von Eiswasser umgeben war. Das Homogenat wurde nach 27 fraktioniert und die Sedimente ausgezählt.

Die Tourenzahl des Bühler-Homogenisators ist in 14 Stufen regulierbar; es gibt fünf Messer verschiedener Größe, die man je nach der Menge des zu verarbeitenden Gutes wählt. Bei Homogenisation von z. B. 10 g Wurzeln in 30 ccm gesättigter RZ-Lösung erwiesen sich die mit Messer Nr. 2 auf Stufe 8 bis 9 erzielte Tourenzahl und eine Dauer von 2 Minuten als geeignete Homogenisationsbedingungen.

Wichtig: Um auf den verschiedenen Stufen konstante Tourenzahlen zu erzielen, muß man den Bühler-Homogenisator von der höchsten bis zu den niedrigsten Stufen je etwa 1 Minute leer laufen lassen.

| | | | | |
|---|-------|-----|------------|--------------|
| A | Stufe | 8 | 2 Minuten | Messer Nr. 2 |
| B | Stufe | 4-5 | 30 Minuten | Messer Nr. 2 |
| C | Stufe | 10 | 2 Minuten | Messer Nr. 2 |

Tabelle 6

| Versuch | % | | «kleine Teilchen» | Wände | Sicherheit des Unterschiedes A : B |
|---------|----------|------------------|-------------------|----------|------------------------------------|
| | total | Kerne (Kat. 1+2) | | | |
| I A | 37 ± 2,4 | (10 ± 1,5) | 9 ± 1,5 | 54 ± 2,4 | P < 0,001 |
| B | 23 ± 1,9 | (2 ± 0,6) | 26 ± 2,0 | 51 ± 2,3 | |
| II A | 28 ± 3,2 | (8 ± 1,8) | 13 ± 2,3 | 59 ± 3,3 | P < 0,001 |
| B | 20 ± 2,8 | (1 ± 0,7) | 26 ± 3,0 | 54 ± 3,4 | |
| III A | 32 ± 3,6 | (18 ± 3,0) | 2 ± 1,1 | 66 ± 3,7 | P < 0,001 |
| C | 13 ± 2,4 | (6 ± 1,7) | 6 ± 1,7 | 81 ± 2,9 | |

Das Homogenat B enthielt mindestens die Hälfte weniger Partikel als A.

Auffällig ist die große Menge der «kleinen Teilchen» unter B und C. Da die Dichte des Mediums, in dem zentrifugiert wurde, stets etwa 1,3 betrug, ist es unwahrscheinlich, daß so viel Plasma sedimentierte, wie die Zahlen für Kat. 5 angeben (siehe auch 3). Wahrscheinlich ist, daß unter den ungeeigneten Homogenisationsbedingungen von B und C bedeutend mehr Kerne und Wände bis zum Grade der «kleinen Teilchen» zerkleinert wurden als bei A. Auch die relativ geringe Ausbeute an Kernen der Kat. 1 und 2 bei B und C spricht für diese Annahme.

25.2 Versuche mit Pektinasen

Um den Aufschluß der Zellwände zu erleichtern, wurde versucht, die Wurzeln mit Enzymen zu digerieren. So sollte erreicht werden, daß – ohne die Tourenzahl zu erhöhen und länger zu homogenisieren und damit die Kerne mehr zu beschädigen – die Wurzeln gründlicher homogenisiert und die Ausbeute an Kernmaterial größer würde; oder aber die ohne Enzymbehandlung erzielbare Ausbeute ließe sich nun bei niedrigerer Tourenzahl und innert kürzerer Zeit erhalten, was eine Erhöhung des relativen Anteiles an unbeschädigten Kernen zur Folge haben müßte. Zellulasen sind im Handel nicht erhältlich, wohl aber Pektinasepräparate, das heißt Enzymgemische, welche die Mittellamelle abbauen. Bereits Chayen (1949, 1952) und Brown (1951) verwendeten Pektinasen zur Mazerierung pflanzlicher Gewebe.

Fein zerkleinerte Zwiebelwurzeln wurden mit 2% Pectasin (P)¹ oder Takamine (T)² in 10%iger RZ-Lösung (Unlösliches abfiltriert) bei 35° C inkubiert. Die Lösung wurde mit einigen Tropfen Essigsäure auf pH 4 eingestellt. (Das pH-Optimum der Pektinasewirkung liegt im leicht sauren Gebiet.) Eine Kontrolle wurde ohne Enzym behandelt. Nach 2 Stunden Inkubation wurden die Wurzeln sorgfältig in 10%iger RZ-Lösung gewaschen und nach 27 verarbeitet. Die Homogenate von P und T bildeten einen geleeartigen Brei, der schlecht filtrierte.

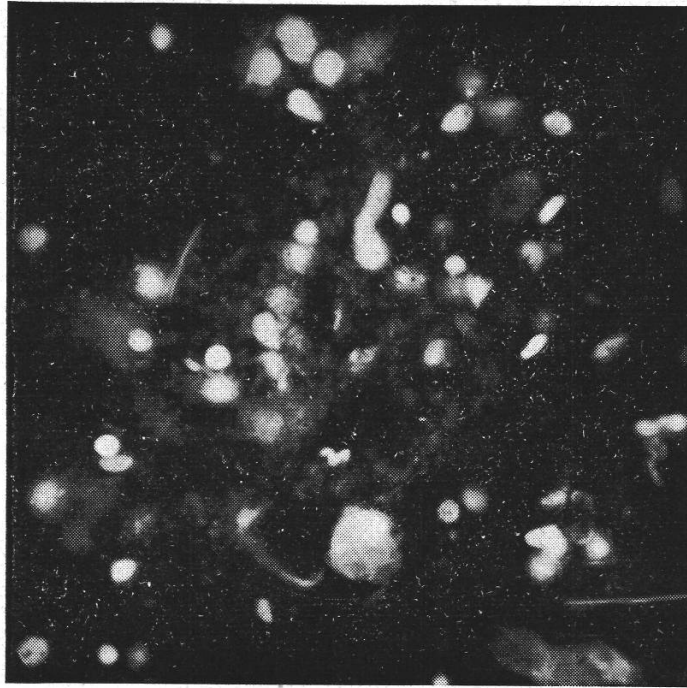
In den Sedimenten von P und T waren die Zellwände weitgehend zu kleinen, feinen Fetzen desintegriert, die sich oft nur schwach fluorochromieren ließen und die ebensogut unter Kat. 5 («kleine Teilchen») hätten eingereicht werden können (Fig. 6). Größere Zellwandstücke waren – im Gegensatz zur Kontrolle – nur spärlich anzutreffen. Die Pektinasebehandlung hatte also zur Folge, daß die Zellulosemembranen im Mixer viel stärker zerkleinert wurden, sobald einmal die verkittende Mittellamelle aufgelöst war.

Hinsichtlich der absoluten und relativen Kernmenge ergaben sich gegenüber der Kontrolle keine bedeutenden Unterschiede, doch zeigten in den enzymbehandelten Präparaten mehr Kerne ein mikroskopisches Bild, das auf Massenschwund schließen ließ: inhomogene innere Struktur; dichte, intensiv grün fluoreszierende Kernbezirke wechselten mit kaum gefärbten Partien ab. Manche Kerne sahen aus, als ob ihre Oberfläche überall bläschenartig ausgebuchtet gewesen wäre (vgl. 24.2).

Die Wirkung der Pektinasepräparate auf das Zytoplasma und den Zellkern wurde an Zwiebelhäutchen genauer untersucht. Dabei zeigte es sich, daß gleichzeitig mit dem Abbau der Mittellamelle ein Zellkernabbau vor sich ging, indem die fluorochromierten Kerne bereits nach kurzer Enzymeinwirkung (P) tief orange und wenig später zinnoberrot fluoreszierten

¹ Rohm & Haas Comp., Philadelphia; Pectasin 10-M.

² Takamine Lab. Inc., Clifton (New Jersey); Pektizyme Concentrate F-5931.



Figur 6

Zellkernsuspension, hergestellt nach 27
Wurzeln vor Homogenisierung mit Pektinase inkubiert
Vergrößerung 400 ×

– eine Farbe, welche sonst nie beobachtet werden konnte. Die Intensität dieser Rotfluoreszenz nahm fortwährend ab, und nach 4 bis 5 Stunden war in den nunmehr voneinander getrennten Zellen nur noch eine von der Zellwand abgelöste, schwach kupferrot fluoreszierende Plasmahülle ohne Zellkern zu erkennen. Zusatz von 1% bakteriologischem Pepton (Chayen, 1952; Brown, 1951) verzögerte diesen Kernabbau, verhinderte ihn aber nicht.

In Anbetracht dieser unkontrollierbaren Einwirkung der geprüften Pektinasepräparate auf den Zellkern und weil andererseits die durch Pektinasebehandlung bewirkte Zertrümmerung der Zellwände in kleine und kleinste Teilchen sich bei der Fraktionierung der Homogenate als nachteilig erwies, wurde auf weitere Anwendung von Pektinasen verzichtet.

26 Fraktionierung

Zur Fraktionierung des Homogenates kommen Größen-, Dichte-, Oberflächenadsorptions- und Ladungsunterschiede der Zellteilchen in Betracht. Größe und evtl. auch Adsorption spielen beim Filtrieren, Größe, Form und Dichte beim Zentrifugieren eine Rolle.

Ladungsunterschiede der Teilchen könnten möglicherweise für eine Trennung durch Elektrophorese ausgenutzt werden. (Yama ha und Ishii,

1933, bestimmten mit einer mikroskopisch kontrollierbaren Elektrophoresekammer den IEP pflanzlicher Protoplasten, besonders den des Zellkerns und der Plastiden, und MacLean, 1957, mit einer verbesserten Kammer den IEP und die elektrophoretische Beweglichkeit von Protoplasten, Chloroplasten und Mitochondrien.)

26.1 Filtration

Das Homogenat wurde jeweils durch feinmaschiges Tuch abgepreßt, um unzerschlagenes Gewebe abzutrennen. Danach enthielt das Homogenat noch Partikel folgender Größenordnung:

| | |
|-------------------|-----------------|
| Zellwandstücke | 5–20–100 μ |
| (Stärkekörner | 5–10–20 μ) |
| Zellkerne | 5–10 μ |
| «kleine Teilchen» | <2 μ |

Es wurde nun versucht, mit Hilfe einer Filtration durch Glaswolle, durch feinstes Tuch oder durch feinstes Metallgitter wenigstens einen Teil der Zellwandstücke abzutrennen.

1. Vergleich: *Tuch und Glaswolle* (Tab. 7)

- A. Berliner Porzellansiebtiigel, ausgelegt mit einer (oder mehreren) Lage feinstmaschigen Baumwolltuches, lichte Porenweite durchschnittlich 80 μ .
- B. Tiegel und Tuch (wie A), dazu mehrere Lagen feinst verteilter Glaswolle (insgesamt etwa 1 cm stark).

Beide Filter mit RZ-Lösung imbibiert, Homogenat durchsickern gelassen (evtl. mit Wasserstrahlpumpe schwach abgesaugt), Filtrat zentrifugiert (nach 27).

Tabelle 7

| % | Kernmaterial | «kleine Teilchen» | Zellwände | Sicherheit des Unterschiedes |
|---|--------------|-------------------|--------------|------------------------------|
| A | 21 \pm 3,7 | 12 \pm 3,0 | 67 \pm 4,3 | 0,01 > P > 0,001 |
| B | 41 \pm 5,3 | 13 \pm 3,7 | 47 \pm 5,4 | |

Mit dem Glaswollefilter erhöhte sich also der relative Anteil des Kernmaterials auf Kosten des Zellwandanteils aufs Doppelte. Andererseits war die Sedimentausbeute etwa fünfmal geringer, die Ausbeute an Kernmaterial also etwa zwei- bis dreimal kleiner. Vorsichtiges Auswaschen des Filters vermochte die Ausbeute nur unwesentlich zu erhöhen.

2. Vergleich: *Tuch und Metallgitter* (Tab. 8)

A. Tuch, wie oben.

B. Gitter aus Chromnickelstahl, lichte Porenweite $29 \mu^1$. Arbeitsgang wie oben.

Tabelle 8

| % | Kernmaterial | «kleine Teilchen» | Zellwände | Sicherheit des Unterschiedes |
|---|--------------|-------------------|--------------|------------------------------|
| A | $27 \pm 1,8$ | $5 \pm 0,9$ | $68 \pm 1,9$ | $0,05 > P > 0,01$ |
| B | $34 \pm 1,9$ | $5 \pm 0,9$ | $61 \pm 2,0$ | |

Das Gitter eliminierte mehr Zellwände als das Tuch. Für die Standardmethode (27) fand das Gitter Verwendung.

26.2 *Fraktionierung durch Zentrifugieren*

Bei gegebener Beschleunigung (g-Zahl) und Zeitdauer sedimentieren die Teilchen eines Homogenates in Rohrzuckerlösung von bestimmter Dichte und Viskosität mit verschiedener Geschwindigkeit, die von der Dichte der Teilchen und vom Verhältnis ihrer Oberfläche zum Volumen abhängt. Durch Wahl geeigneter Werte für die Parameter: g-Zahl, Zentrifugierdauer und Dichte des Mediums, ist es möglich, bestimmte Komponenten des Homogenates gegenüber den anderen anzureichern («fraktioniertes Zentrifugieren»).

Bei der einfachen Zentrifugiertechnik wird ein Röhrchen mit Homogenat angefüllt und zentrifugiert. Hierbei verringert die ungleiche Strecke, welche die Teilchen bis zum Grunde des Röhrchens zurückzulegen haben, den Effekt einer Anreicherung auf Grund verschiedener Sedimentationsgeschwindigkeit. Besser ist, im Röhrchen ein kleines Volumen Homogenat mit einer relativ hohen Säule reinen Mediums zu unterschichten: Die zurückzulegende Strecke ist dann für alle Teilchen ungefähr gleich groß (Schichtentechnik).

Besteht zwischen zwei zu trennenden Zellkomponenten ein konstanter Dichteunterschied, so wird für das zu unterschichtende Medium zweckmäßig eine dazwischen liegende Dichte gewählt, so daß die eine Komponente an der Schichtengrenze zurückgehalten wird, die andere aber sedimentiert. Mein Ziel war nun, ein RZ-Medium von solcher Dichte zu finden, daß einerseits möglichst wenig Zytoplasma («kleine Teilchen») sedimen-

¹ Hersteller: Bopp & Co., Zürich 46.

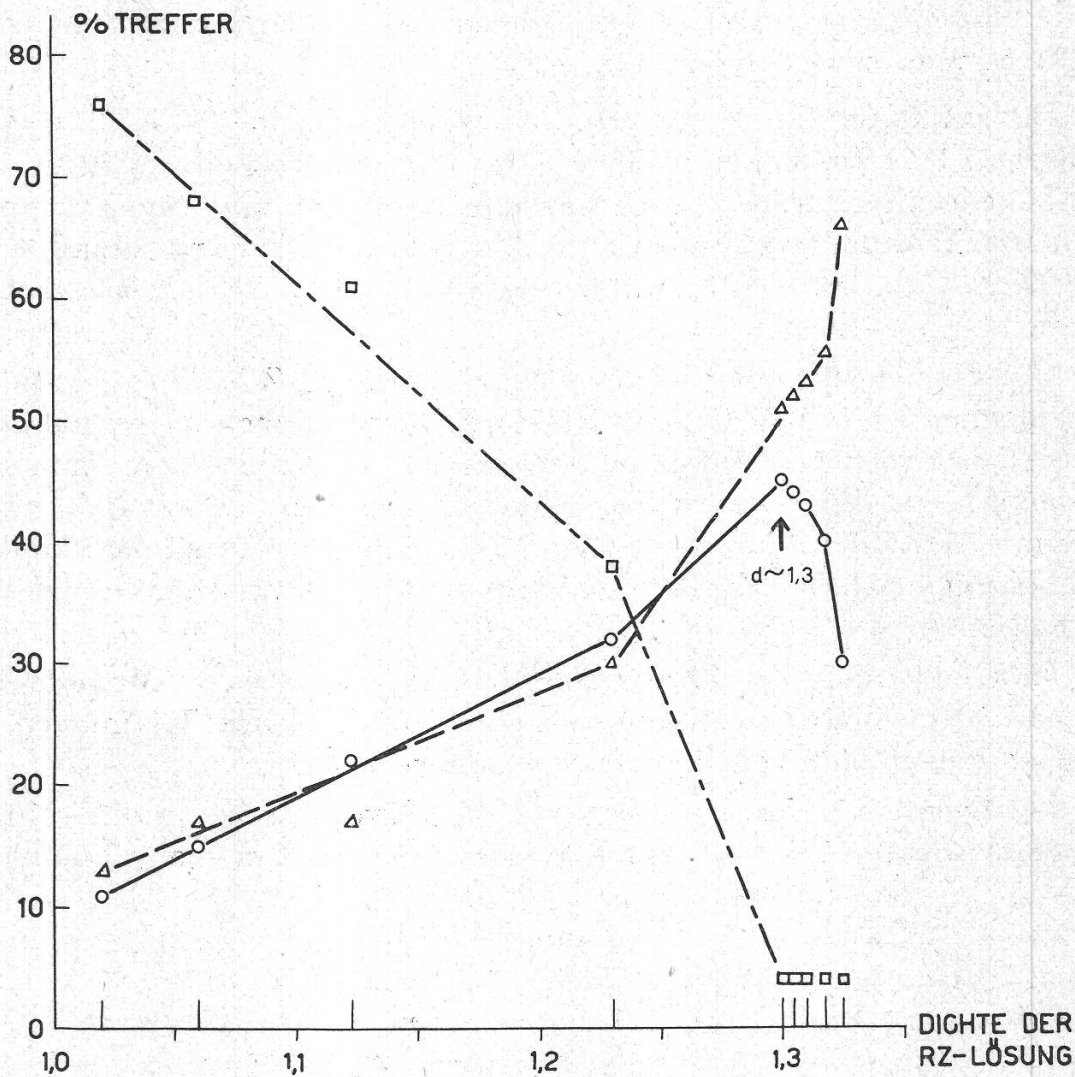
tierte, andererseits aber eine möglichst hohe Ausbeute an Kernmaterial resultierte. Figur 7 zeigt, wie sich die relativen Anteile der Zellkomponenten am Sediment bei Erhöhung der RZ-Konzentration des Mediums verschieben (Zeitdauer und g-Zahl konstant).

Nach 27 hergestelltes Homogenat wurde mit RZ-Lösung folgender Dichte unterschichtet und zentrifugiert:

1,018 1,059 1,127 1,230 1,305 1,310 1,318 1,325,

wobei in RZ-Lösung von je entsprechender Dichte homogenisiert worden war.

Das Unterschichtete mußte etwas dichter als das darüberstehende Homogenat sein; andernfalls vermischten sich die beiden Schichten – besonders schnell die wenig viskosen Schichten niedriger RZ-Konzentration. (Anderson, 1955b, diskutiert die Ursachen solcher Störungen: z. B. Konvektionsströmung durch Erwärmung u. a.)



Figur 7

Zusammensetzung der Sedimente in Abhängigkeit von der Dichte des unterschichteten RZ-Mediums

- ——— ○ Zellkernmaterial (Kat. 1-4)
- △ ——— △ Zellwände (Kat. 6)
- ——— □ «kleine Teilchen» (Kat. 5)

Achse der Röhrechen während des Zentrifugierens parallel zur Kraftrichtung. Optimale Zeitdauer und g-Zahl wurden empirisch gesucht; für Medien der Dichte 1,23 oder weniger: 30 Minuten, 400 g an der Grenze der Schichten bzw. 500 g am Grunde des Röhrechens; für Medien der Dichte 1,3 oder mehr: 90 Minuten, 1300 bzw. 1700 g.

Aus der Figur geht hervor, daß mit steigender RZ-Konzentration des Mediums der relative Anteil von Kernen und Zellwänden am Sediment zunimmt und derjenige der «kleinen Teilchen» (Kat. 5) abnimmt. Bei einer Dichte über 1,3 bleibt der Anteil der «kleinen Teilchen» konstant tief. (An der Schichtengrenze bildete sich jeweils ein milchiger Kranz von weniger dichtem Material.) Daraus folgt, daß die Zytoplasmateilchen zur Hauptsache eine Dichte von weniger als 1,3 aufwiesen. (Vgl. Chauveau et al., 1956 und 1957.) Möglicherweise waren die bei einer Dichte von 1,3 oder mehr sedimentierenden «kleinen Teilchen» eher kleine Kern- und Zellwandtrümmer (siehe 3.1 und 3.2).

Der Zellkernanteil war am größten bei einer Dichte des Mediums von 1,300 bis 1,305. Bei höherer Dichte stieg der relative Zellwandanteil auf Kosten jenes der Kerne: Nicht mehr alles Kernmaterial vermag in einem so dichten Medium zu sedimentieren. Der Großteil der Kerne besaß somit eine Dichte von rund 1,3, während die Zellwände wesentlich dichter waren.

Unterschichtung eines Homogenates mit einer RZ-Lösung der Dichte 1,3 ermöglichte somit die Gewinnung von Zellkernsedimenten, die nur noch einen kleinen relativen Anteil an «kleinen Teilchen» aufwiesen. Ein gutes Sediment zeigte durchschnittlich folgende Zusammensetzung: 40 % Kernmaterial, 55 % Zellwände, 5 % «kleine Teilchen». Der Anteil der «kleinen Teilchen» ließ sich bei sorgfältigem Arbeiten meist unter der Grenze von 5 % halten.

Tabelle 9 zeigt die Zusammensetzung einiger in RZ-Medium der Dichte 1,3 gewonnener Zellkernsedimente. Die Zahlen in Klammern bedeuten die nach 23.3 berechneten Volumenwerte.

Das Verhältnis von Kernmaterial zu Zellwänden schwankte. Möglicherweise wirkten sich hier auch Unterschiede in den mengenmäßigen

Tabelle 9

| Nr. | % | Kerne | «kleine Teilchen» | Wände |
|-----|---|---------------|-------------------|---------------|
| 1 | | 35 ± 4,3 (43) | 4 ± 1,8 (<2) | 61 ± 4,4 (56) |
| 2 | | 32 ± 3,6 (40) | 2 ± 1,1 (1) | 66 ± 3,7 (59) |
| 3 | | 41 ± 3,0 (47) | 4 ± 1,2 (<2) | 55 ± 3,0 (51) |
| 4 | | 34 ± 1,9 (40) | 5 ± 0,9 (<2,5) | 61 ± 2,0 (58) |
| 5 | | 44 ± 3,1 (51) | 4 ± 1,2 (<2) | 52 ± 3,1 (48) |
| 6 | | 37 ± 2,7 (44) | 3 ± 1,0 (>1) | 60 ± 2,8 (55) |

Anteilen von Kern- und Membranmaterial in den Wurzeln selbst aus (in alten Wurzeln ist das Verhältnis Zellwände zu Zellkerne größer als in jungen).

Zum Vergleich die registrierten Treffer- und die errechneten Volumenanteile für ein in RZ-Lösung der Dichte 1,018 (10 Gew.%) gewonnenes Sediment:

| | | | |
|---|---------------|----------------------------|---------------|
| % | <i>Kerne</i> | « <i>kleine Teilchen</i> » | <i>Wände</i> |
| | 15 ± 2,1 (26) | 68 ± 2,7 (49) | 17 ± 2,2 (25) |

Interessant ist auch der Vergleich des relativen Anteils der verschiedenen Kernkategorien in Sedimenten, die in dichter ($d = 1,3$), verdünnter ($d = 1,018$) RZ-Lösung oder in destilliertem Wasser hergestellt wurden: Tabelle 10.

Tabelle 10

%-Anteil der Zellkernkategorien

- A RZ-Medium, Dichte 1,3 (die Versuchsnummern entsprechen denjenigen in Tab. 9)
 B destilliertes Wasser
 C RZ-Medium, Dichte 1,06 (10%)

| Versuch | Total | 1 | 2 | 3 | 4 | 1+2 | 3+4 | 1+2 : 3+4 |
|---------|-------|-------|------|-----|------|------------|-------------|-------------|
| A 1 | 35,5 | 11,5 | 11,5 | 5 | 7,5 | 23 (32) | 12,5 (11) | 1,85 (2,9) |
| 2 | 32 | 13 | 5 | 7,5 | 6,5 | 18 (26) | 14 (14) | 1,3 (1,85) |
| 3 | 40,5 | 10,5 | 10,5 | 6,5 | 13 | 21 (29) | 19,5 (18) | 1,1 (1,6) |
| 4 | 34 | 6,5 | 8,5 | 8,5 | 10,5 | 15 (21) | 19 (18) | 0,8 (1,15) |
| 5 | 43,5 | 13 | 10 | 7,5 | 13 | 23 (32) | 20,5 (19) | 1,1 (1,7) |
| 6 | 37 | 7,5 | 12 | 5,5 | 11 | 20,5 (29) | 16,5 (15) | 1,25 (1,95) |
| B I | 15 | ≤ 1 | 4,5 | 2 | 8,5 | 4,5 (9) | 10,5 (14) | 0,45 (0,65) |
| II | 11 | — | 4,5 | 0,5 | 6 | 4,5 (10,5) | 6,5 (10) | 0,7 (1,05) |
| III | 8,5 | — | 3 | 2 | 3,5 | 3 (7) | 5,5 (8,5) | 0,55 (0,8) |
| C I | 18,5 | — | 6 | 3 | 9,5 | 6 (12) | 12,5 (16,5) | 0,5 (0,75) |
| II | 15 | < 0,5 | 4,5 | 2 | 8,5 | 4,5 (10) | 10,5 (15,5) | 0,45 (0,65) |
| III | 9 | — | 2,5 | 3 | 3,5 | 2,5 (5,5) | 6,5 (9,5) | 0,4 (0,60) |

Aus den Zahlen geht eindeutig hervor, daß im dichten Medium während des Homogenisierens und Zentrifugierens viel weniger Kerne zerstört wurden: Etwa 60% des Kernvolumens entfallen hier auf die Kat. 1 und 2, während es in destilliertem Wasser oder verdünnter («isotonischer») RZ-Lösung nur rund 40% sind. Es gab in verdünnten Medien relativ viel mehr Treffer der Kat. 4 (Kernstriemen). Auch Johnston et al. (1957) fanden, daß dichtes Medium die Kerne besser schützt.

26.3 Ultrazentrifuge

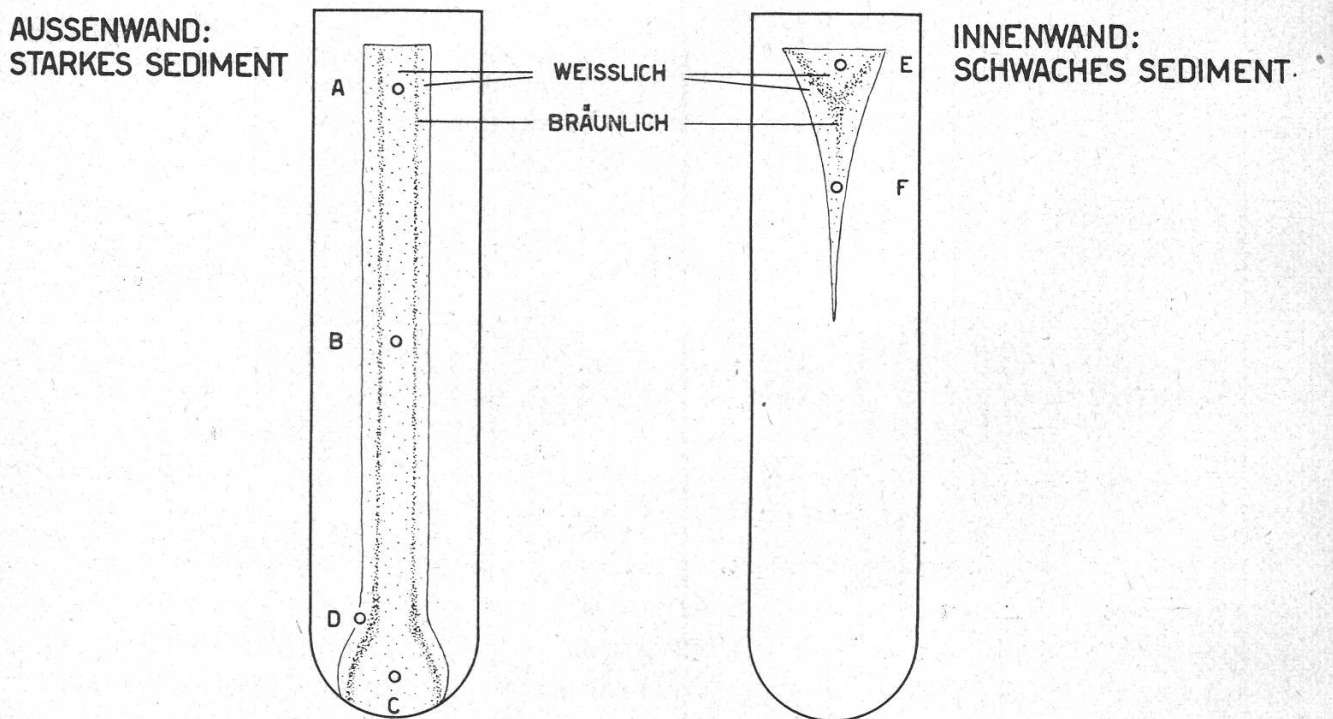
Sobald das Medium dichter als 1,3 war, sedimentierte das Kernmaterial in der gewöhnlichen Zentrifuge nicht mehr quantitativ, während der relative Anteil der Zellwände rasch anstieg. Letztere sind also merklich dichter.

Es wurde nun versucht, ein Medium zu finden, das dichter ist als der Großteil der Kerne, aber weniger dicht als die Wände, so daß bei Anwendung hoher g-Zahlen, wie sie in der Ultrazentrifuge zu erzielen sind, die Wände sedimentieren, die Kerne aber aufrahmen würden.

Die größte Dichte, die mit RZ erreicht werden konnte, ohne daß sich im Medium bei Zimmertemperatur während der Dauer der Versuche (rund 2 Stunden) störende Mengen von RZ-Kristallen bildeten, war 1,335.

Nach 27 hergestelltes Sediment wurde in RZ-Lösung der Dichte 1,32 bzw. 1,33 suspendiert und bei folgenden Bedingungen zentrifugiert (Spinco-Ultrazentrifuge, Mod. L, Rotor 40, Winkel der Röhrenachsen mit der Drehachse 26°): 25 000 U entsprechend 56 000 g unten an der Außenwand bzw. 26 000 g oben an der Innenwand des Röhrchens, 30 Minuten.

Figur 8 zeigt die Verteilung des Sedimentes im Röhrchen, und Tabelle 11 gibt das Teilchenverhältnis für die verschiedenen Sedimentzonen wieder.



Figur 8

Verteilung des Sedimentes im Ultrazentrifugenröhrchen

Tabelle 11

| Stelle Im Röhrchen | % | Kerne Kat. 1-4 | «kleine Teilchen» Kat. 5 | Wände Kat. 6 | Sicherheit des Unterschiedes in bezug auf Kat. 5 |
|-----------------------|---|-------------------|-----------------------------|-----------------|--|
| A | | 20 ± 2,1 | 6 ± 1,0 | 74 ± 2,3 | A:B 0,01 > P > 0,001 A:C, A:D P < 0,001 |
| B | | 25 ± 2,3 | 1 ± 0,5 | 74 ± 2,3 | |
| C | | 18 ± 1,8 | 1 ± 0,5 | 81 ± 1,8 | |
| D | | 20 ± 1,0 | — | 80 ± 1,0 | |
| E | | 6 ± 1,5 | 45 ± 3,7 | 49 ± 3,7 | E:F P < 0,001 |
| F | | 5 ± 1,3 | 25 ± 2,6 | 70 ± 2,8 | |

Mit einer Mediumsdichte von 1,32 gelingt es, die gefährlichen «kleinen Partikel» weiter zu eliminieren, indem diese an der Innenwand des Röhrchens angereichert werden, während die unteren Zonen des Sedimentes der Außenwand praktisch frei davon bleiben. Hingegen gelang es nicht, die Kerne gegenüber den Zellwänden weiter anzureichern: Der Hauptteil der Kerne sedimentierte mit den Wänden.

Wurde die Dichte auf 1,33 erhöht, sedimentierten etwa zwei Drittel der Kerne mit dem Hauptteil der Wände an der Außenwand und ein Drittel mit wenigen Wänden und den «kleinen Teilchen» zusammen an der Innenwand.

Johnston et al. (1957) trennten mit den gleichen Zentrifugierbedingungen in einem RZ-Medium, dessen Dichte ungefähr 1,32 betrug (205 g Zucker/100 ml Wasser), Zellkerne aus Weizenembryonen von den Zellwänden ab.

Dichter als gesättigte RZ-Lösungen und viel weniger viskos waren nahezu gesättigte Lösungen von Dijodon (Diäthanolat der 3,5-Dijodo-5-pyridon-N-essigsäure), etwa 65%ige Lösung, Dichte 1,35, und Triurol (Natriumsalz der 3-Acetylamino-2,4,6-trijodo-benzoessäure, Lösung mit NaOH neutralisiert), etwa 65%ige Lösung, Dichte 1,44¹. Doch zeigten in diesen Lösungen suspendierte Kerne innert kurzer Zeit einen Massenschwund von ähnlich großem Ausmaß wie in destilliertem Wasser (vgl. 24.4). Ottesen und Weber (1955) trennten mit Hilfe eines Dichtegradienten aus einer Mischung von RZ- und Dijodon-Lösung – die maximale Dichte des Gradienten betrug rund 1,3 – die Zytoplasmakomponenten von *Xenopus*-Eiern. Von einer Beeinflussung der Teilchen durch dieses Medium berichteten sie nichts.

¹ Diese Salze werden als Röntgenkontrastmittel gebraucht. Hersteller: Aktiebolaget Leo, Hälsingborg, Schweden.

Auch konzentrierte Lösungen von Cadmiumchlorid (Kessler, 1957, verwendete konzentrierte Cadmiumchloridlösung, um Siebröhrenkallose von Zellmembranen und Stärke zu reinigen) erwiesen sich aus dem gleichen Grunde als ungeeignet.

27 Standardmethode

Auf Grund der angeführten Untersuchungen erweist sich zur Anreicherung von Zellkernen folgender Arbeitsgang als zweckmäßig:

1. Wurzeln in fließendem Wasser, dann in destilliertem Wasser gründlich waschen, abtrocknen.
2. Wurzeln fein zerschneiden und mit dem dreifachen Volumen gesättigter RZ-Lösung (ohne irgendwelchen Zusatz) im Bühler-Homogenisator bei Stufe 8 bis 9 2 Minuten homogenisieren.
3. Homogenat durch Tuch abpressen und durch Chromnickelstahlgitter (29μ Porendurchmesser) langsam filtrieren (evtl. leicht absaugen).
4. Homogenat im Zentrifugenröhrchen mit konzentrierter RZ-Lösung, Dichte 1,305, 3 cm hoch unterschichten. Pro Röhrchen höchstens so viel Homogenat, als RZ-Lösung unterschichtet wird.
5. 90 Minuten bei 3400 U (700 g–1250 g–1650 g bzw.) zentrifugieren. (Eventuell 6. Zwecks praktisch vollständiger Eliminierung der «kleinen Teilchen» Sediment in konzentrierter RZ-Lösung, Dichte 1,32, suspendieren und 30 Minuten in der Spinco-Ultrazentrifuge, Rotor 40, bei 25 000 U zentrifugieren.)

Vorgänge 2. bis 6. bei tiefer Temperatur (etwa 5° C) durchführen.

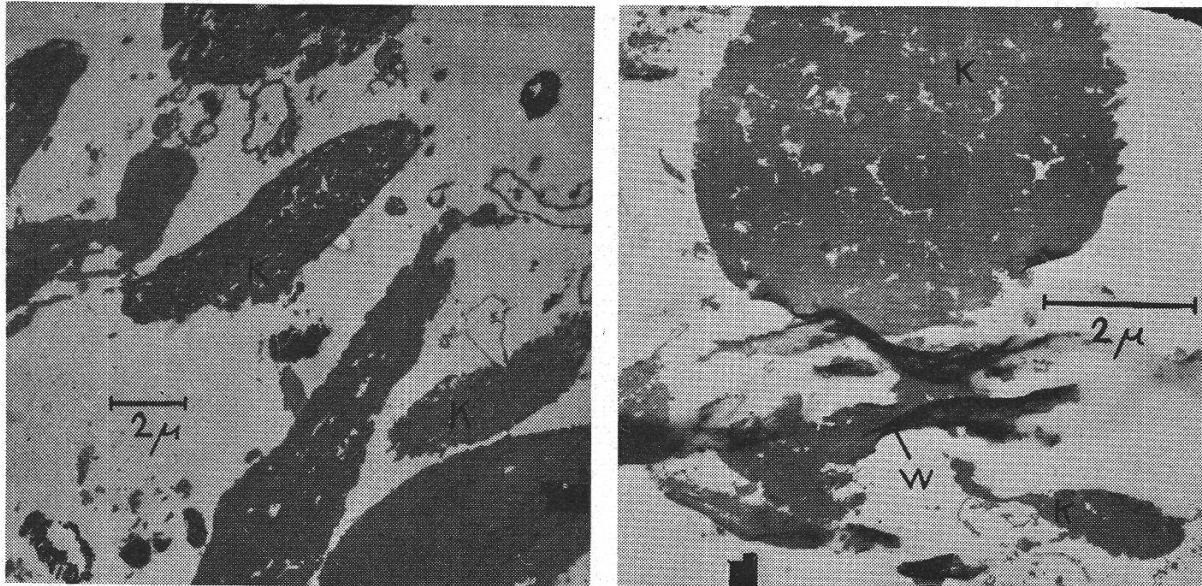
28 Fixierung der Sedimente

Die Sedimente können durch Gefriertrocknung fixiert werden. Der weitaus größte Teil des Trockenpulvers besteht dann aus Rohrzucker. Wenn dieser die geplanten Analysen stört, werden die Sedimente mit einem Gemisch von Wasser und organischer Flüssigkeit (wie Azeton oder Äthanol), deren Konzentration in einer Reihe ansteigt, fixiert – wobei der Zucker vom Wasser aufgenommen wird – und hierauf getrocknet (vgl. Siebert, 1956).

29 Elektronenmikroskopische Kontrolle der Sedimente

Um zu prüfen, ob die Zellkernsedimente als Verunreinigung auch submikroskopische Zytoplasmateilchen enthalten, wurden nach 27 hergestellte Sedimente dreimal in 50%igem Äthanol ausgewaschen, um den

RZ-Überschuß zu entfernen, 2 Stunden lang in gepufferter (Veronalpuffer, pH 7,1), 1%iger OsO₄-Lösung fixiert, in Methacrylat eingebettet und mit einem Diamantmesser geschnitten.



Figuren 9 und 10

Elektronenaufnahmen von Ultraschnitten eines Zellkernsedimentes

K Zellkern, Zellkernfragment

W Zellwand

Das Aussehen der Zellkerne und -fragmente in den elektronenmikroskopischen Aufnahmen (Fig. 9 und 10) ist in verschiedener Hinsicht interessant. Der Kontrast der Kerne ist ungewöhnlich stark, was auf eine relativ hohe Massendichte hinweist. Sodann erscheinen die Kerne mehr oder weniger homogen; keine definierbare Innenstruktur und keine Kernmembran sind mehr zu erkennen.

In den Zellwänden ist keine Fibrillentextur sichtbar, da die Zellulose von Pektin und Hemizellulosen verdeckt ist. Möglicherweise haftet an den Wänden auch noch eine feine Zytoplasmaschicht, deren geringe Masse jedoch vernachlässigt werden dürfte.

Da weder Kerne noch Wände eine Feinstruktur zeigen, ist eine sichere Unterscheidung von Kern- und Wandfragmenten oft unmöglich.

Auf keinem Bilde wurden Formen angetroffen, welche an Mitochondrien oder Mikrosomen, wie sie aus Arbeiten anderer Autoren bekannt sind, erinnern. Somit geht aus dieser Kontrolle hervor, daß die Zellkernsedimente keine submikroskopischen Zytoplasmateilchen enthalten.

3 Diskussion

31

Chemische Analysen von Kernsedimenten lassen nur dann quantitative Schlüsse über den Zellkernchemismus zu, wenn der Grad der Verunreinigung der Sedimente mit Zytoplasma genügend klein ist. Die Zellwände im Sediment hingegen verfälschen die Kernanalysen nicht, da sie aus völlig anderen Stoffen bestehen (siehe 33). Mit der beschriebenen Methode ist es möglich, ein Sediment zu erhalten, dessen Volumen zu je rund 50% aus Kernmaterial bzw. Zellwänden besteht, während das Volumen jener Teilchen, die – nach ihrer Größe zu schließen – Zytoplasmateilchen sein könnten, höchstens 2 bis 3% ausmacht. Es ist aber damit zu rechnen, daß auch ein Teil dieser Menge kleinste Kern- oder Zellwandtrümmer darstellt. Es konnte nämlich festgestellt werden, daß bei ungünstiger Tourenzahl, bei zu langem Homogenisieren oder nach Pektinasebehandlung sich mehr «kleine Teilchen» im Sediment vorfanden. Sicherlich hängt aber der Zytoplasmaanteil im Kernsediment nicht von einem Homogenisationsoptimum ab, denn das Zytoplasma wird unter allen Bedingungen leicht und rasch freigesetzt. Vielmehr schreitet bei ungünstigen Homogenisationsbedingungen die Zertrümmerung von Kernen und Wänden weiter als sonst, und die Ausbeute an «kleinen Teilchen» wird erhöht. Dies zeigt also, daß die sogenannten «kleinen Teilchen» (Kat. 5) auch Kern- oder Wandpartikel sein können.

32

Ein weiterer Punkt spricht dagegen, daß alle «kleinen Teilchen» Zytoplasmapartikel sind, nämlich die hohe Dichte – rund 1,3 – des Mediums, in welchem die Sedimente gewonnen wurden.

Tabelle 12 vereinigt Angaben über die Dichte von Zellkomponenten. Die Dichte des Zellkerns und der Zytoplasmakomponenten hängt stark vom Isolierungsmedium ab. Pfeiffer (1935) gibt für eben isolierte Zellkerne von *Spirogyra maiuscula* eine Dichte von 1,094 an (Medium: wäßriger Chloräthylalkohol). In konzentrierten Rohrzuckerlösungen sind die Kerne viel dichter: In RZ-Glyzerinlösung der Dichte 1,17 sedimentierten Rattenleberkerne (Albright und Anderson, 1958), und Chauveau et al. (1956 und 1957) geben die Dichte von in gesättigter RZ-Lösung isolierten Rattenleberkernen mit 1,4 an. Die Dichte von wasserfreien Zellkernen – sogenannte «Behrens-Kerne» – aus tierischen Geweben beträgt 1,385 bis 1,390 (Behrens, 1935), diejenige von Kernen aus Weizenembryonen 1,416 bis 1,420 (Stern und Mirsky, 1952). In meinen Versuchen sedimentierte das Kernmaterial in einem Medium der Dichte 1,30 bis 1,31 noch mehr oder weniger vollständig, in höherer Dichte aber nicht mehr. Beim Zentrifugieren bei 50000 g und Dichte 1,33 – der höchsten mit RZ-Lösung praktisch erreichbaren Dichte – sedimentierten etwa zwei Drittel des Kernmaterials, der Rest rahmte auf. Die Kerne wiesen also

in einem RZ-Medium von gegebener, hoher Dichte ihrerseits keine einheitliche Dichte auf; und zwar betraf dies mikroskopisch intakte Kerne so gut wie beschädigte.

Um diese hohe Kerndichte in konzentrierten RZ-Medien verstehen zu können, sind noch folgende Umstände zu berücksichtigen: Der durchschnittliche Durchmesser von Kernen in RZ-Lösung der Dichte 1,3 ist um rund 30% kleiner als jener von Kernen in frischen Wurzelschnitten (Tab. 4); das Kernvolumen ist demnach rund ein Drittel des ursprünglichen. Ferner läßt das mikroskopische Aussehen isolierter Kerne (intensive Fluoreszenz bzw. hohe Lichtbrechung im Phasenkontrastmikroskop) sowie die starke Schwärzung der OsO_4 -fixierten Kerne auf den Elektronenbildern auf eine ungewöhnlich hohe Dichte dieser Kerne schließen. Als Ursache dafür nehme ich eine Verdichtung der Kerne durch Wasserentzug an. Wird die Dichte des lebenden Kernes mit rund 1,1 angenommen (vgl. den Wert von Pfeiffer, 1935), so steigt sie – vorausgesetzt, daß nur Wasser entzogen wird – bei einer Verkleinerung des Volumens um zwei Drittel auf 1,3 an, welcher Wert dem tatsächlichen Verhalten der Kerne beim Zentrifugieren recht gut entsprechen würde.

Auf welche Weise kann der Wasserverlust der isolierten Kerne im konzentrierten RZ-Medium zustande kommen? Nach Strugger (1926; bei *Hordeum vulgare*) und Battin (1959; bei Amphibien-Oocyten) wird unterhalb pH 6 der Kern zu einer gelartigen Masse verfestigt. Das pH meines RZ-Mediums betrug rund 5,5; die Möglichkeit zu einer solchen Veränderung war damit gegeben. Indirekt war der Gelzustand des Kernmaterials daran zu erkennen, daß Kerne, welche am Rande beschädigt waren, ihre Ellipsoidform beibehielten, nicht «zerflossen»; auch die Kerntrümmer und die Kernstriemen veränderten ihre ausgeprägten Formen nicht. (Battin: "... retains its shape even after removal of the nuclear membrane and can cut into pieces ...") Wahrscheinlich bewirkt nun das konzentrierte RZ-Außenmedium eine Entquellung dieses Geles. Dabei dürfte die Kernmembran kein Hindernis für eine Wechselwirkung zwischen Kerngel und RZ-Außenmedium bilden: Die Membran von in RZ-Medien isolierten (tierischen) Zellkernen ist permeabel für Salze, RZ, Nukleotide und gewisse Proteine, wie Hämoglobin (Holtfreter, 1954), Ribonuklease und Desoxyribonuklease (Anderson, 1953a und b). Der Zustand des Kerngeles und damit der Grad der Entquellung mag von Kern zu Kern etwas variieren, was die festgestellte Streuung der Kerndichte zur Folge hätte. Eine wichtige Bekräftigung erfährt diese Hypothese einer Gelentquellung durch die Tatsache, daß bei Zusatz von 0,002 m CaCl_2 zum RZ-Medium eine weitere Volumenverminderung eintrat (siehe Tab. 4): Ca^{++} wirkt auf Gele entquellend.

Das umgebende Medium scheint auch die Dichte der Zytoplasmakomponenten zu beeinflussen; die Differenzen in den Angaben für ein-

Tabelle 12

Dichte von Zellkomponenten

| <i>Objekt</i> | <i>wäßriges Medium, enthält</i> | <i>Dichte</i> | <i>Autor</i> |
|--|---------------------------------|---------------|---------------------------------|
| Zellulose nativ | — | 1,553 | Frey-Wyssling (1959) |
| Stärke | — | 1,50 | Handbook |
| Stärke und Zellulose | Wasser | ~1,60 | Frey-Wyssling (1959) |
| Kerne nach Behrens | — | 1,416–1,420 | Stern und Mirsky (1952) |
| Kerne nach Behrens | — | 1,385–1,390 | Behrens (1935) |
| Kerne von Spirogyra, frisch | Chloräthylalkohol | 1,094 | Pfeiffer (1935) |
| Kerne aus Rattenleber | RZ (konz.) | 1,40 | Chauveau et al. (1956) |
| Kerne aus Rattenleber | RZ | >1,17 | Albright und Anderson (1958) |
| Zytoplasmakomponenten aus Rattenleber | RZ (konz.) | 1,1–1,25 | Chauveau et al. (1956 und 1957) |
| Zytoplasmakomponenten aus Rattenleber | RZ | <1,17 | Albright und Anderson (1958) |
| Mitochondrien-ähnliche Partikel } aus | RZ + Dijodon | 1,10–1,21 | Holter, Ottesen und |
| Mikrosomen-ähnliche Partikel } Xenopus-Leber | | 1,25–1,30 | Weber (1953) |
| Mikrosomen | | <1,16 | |
| Mitochondrien | | 1,19–1,21 | |
| Dottergranulen | | >1,30 | Ottesen und Weber (1956) |
| Pigmentgranulen | | >1,30 | |

ander entsprechende Fraktionen bei den verschiedenen Autoren (Tab. 12) legen dies nahe. Doch ist die Dichte der Zytoplasmakomponenten jeweils geringer als die der Kerne, deren hoher Protein- und Nukleinsäuregehalt entscheidend ins Gewicht fällt. So reichern sich in Dichtegradienten Zytoplasmateilchen in Zonen niedrigerer Dichte als die Zellkerne an (z. B. Albright und Anderson, 1958). Daß Zytoplasmateilchen wie Mitochondrien, Mikrosomen in einem Medium der Dichte 1,3 und darüber sedimentieren, ist meines Wissens nirgends belegt. Von diesem Gesichtspunkt aus ist zu bezweifeln, ob die im Kernsediment enthaltenen «kleinen Teilchen» auch nur zu einem geringen Teil Zytoplasmateilchen sind.

33

Die Zellwände bestehen aus Zellulose, Lignin, Hemizellulosen und Pektinstoffen – alles Substanzen, die dem Kern fremd sind. Zellwände im Sediment verhindern daher die qualitative und quantitative Analyse der Kernstoffe nicht, wohl aber eine direkte Bestimmung des Kerngewichtes.

Aus den Zentrifugierversuchen wird ersichtlich, daß in konzentrierter RZ-Lösung die Zellwände zum großen Teil deutlich dichter sind als die Zellkerne. Aber auch sie zeigen wie die Kerne in dieser Hinsicht eine gewisse Variationsbreite; ein geringer Teil ist sogar weniger dicht als die dichtesten Kerne. Eine vollständige Trennung von Kernen und Wänden mit einer Methode, die auf Dichteunterschieden beruht, ist daher nicht möglich, doch ist eine Anreicherung sowohl von Kernen als auch von Wänden methodisch denkbar. Der Grenzwert für die mögliche Kerndichte beträgt 1,41 bis 1,42 (nach der Behrens-Technik getrocknete Kerne). Die Dichte der Zellulose andererseits beträgt in Helium oder Toluol 1,53 bis 1,54; in Wasser ist sie aber dichter, weil in den Intermizellarräumen durch starke Adsorptionskräfte Wasser komprimiert angelagert wird (Hermans, 1949). Nach Kessler (1958) beträgt die Dichte von Zellulose (und Stärke) in Wasser etwa 1,6. Es fragt sich nun, ob die Zellulose der Wurzelzellwände auch in nahezu gesättigter RZ-Lösung diese hohe Dichte erreicht. Eine Anreicherung der Kerne sollte gelingen, wenn sich ein Medium der Dichte 1,45 bis 1,50 finden ließe, das die Kerne nicht auflöst. Die geprüften Salzmedien dieser Dichte waren wegen ihrer zerstörenden Wirkung auf die Kerne unbrauchbar.

34

Der Verlust an wasserlöslicher Kernsubstanz während der Isolierung ist schwierig abzuschätzen. Als wasserlöslich kommen verschiedene Substanzen in Betracht. In der Proteinfraction sind vor allem die Globuline. Leberzellkerne besitzen bis zu 40% Globuline, ein Teil davon ist wasserlöslich. (Übersicht über Arbeiten, die den Kernchemismus betreffen bei Dounce, 1955, und Brachet, 1957.) Die wasserlöslichen Enzyme, Vitamine und Coenzyme (das native Vorkommen dieser Stoffe im Kern ist im

einzelnen noch sehr umstritten) bilden einen so geringen Mengenanteil, daß sie als möglicher «Massenverlust» kaum in Betracht fallen.

Auch die Ribonukleinsäure im Zellkern ist zum Teil wasserlöslich. Zellkerne aus Säugerleber z. B. enthalten etwa 2,5% RNS und etwa 25% DNS (z. B. Allfrey, Stern, Mirsky und Saetren, 1952: modifizierte Behrens-Technik; Chauveau et al., 1956: konzentriertes RZ-Medium). Hingegen enthalten nach Stern und Mirsky (1952: modifizierte Behrens-Technik) Kerne aus Weizenembryonen ungefähr gleichviel DNS und RNS, nämlich je etwa 5%.

Die absolute Menge an RNS (und an Protein) ist bei allen Kerntypen sehr stark vom Ernährungszustand der Organe und von der metabolischen Aktivität der Zellen abhängig.

Kay und Davidson (1955) zeigten, daß meßbare Mengen RNS verlorengehen, wenn nach der Behrens-Technik isolierte Kerne in wäßrigem Medium (etwa 10%ige RZ-Lösung oder verdünnte Zitronensäure) homogenisiert und zentrifugiert werden. Hingegen konnte ich zeigen (24.2), daß Hefe-RNS in konzentrierter Zuckerlösung etwa viermal schlechter in Lösung geht als in 10%iger Zuckerlösung. Ähnlich dürfte sich das wasserlösliche Protein verhalten. Es darf wohl angenommen werden, daß unter den beschriebenen Isolationsbedingungen der Verlust an Protein und RNS klein ist. Als «Massenverlust», bezogen auf das Gesamtgewicht der Kerne, wird er nicht schwer ins Gewicht fallen. Jedoch schränkt ein solcher möglicher Verlust natürlich die Bedeutung der gemessenen RNS-Werte ein. Es müßten – wie Dounce (1955) fordert – für gültige Aussagen über den RNS-Gehalt die Ergebnisse für mit verschiedenen Methoden isolierte Kerne verglichen werden. Wobei als weitere Komplikation immer hinzukäme, daß – wie oben erwähnt – der natürliche RNS-Gehalt bestimmter Kerne sehr schwanken kann. Es würden sich möglicherweise Unterschiede im RNS-Gehalt zwischen Kernen aus jungen oder alten Wurzeln ergeben oder zwischen Kernen von Pflanzen, die an Licht, und solchen, die in der Dunkelheit gezogen wurden.

4 Zusammenfassung

1. Wurzeln von *Allium Cepa* werden in reiner, konzentrierter Rohrzuckerlösung (Dichte = 1,32; pH 5,5) homogenisiert. Das Homogenat wird durch Musselintuch und feinstes Chromstahlgitter filtriert und zentrifugiert (Schichtentechnik). Eventuell wird das Sediment in RZ-Lösung ($d = 1,32$) suspendiert und mit der Ultrazentrifuge weiter fraktioniert.
2. Die Sedimente werden mit Coriphosphin O fluorochromiert, was eine gute Unterscheidbarkeit der Zellkerne von Zellwand- und Zytoplasmateilchen im Fluoreszenzmikroskop gewährleistet.

3. Die quantitative mikroskopische Analyse der Sedimente erfolgt mit dem Fluoreszenz-, Phasenkontrast- und Polarisationsmikroskop (kombinierte Einrichtung). Die Auszählung wird mit dem Zeiß-Integrationsokular I vorgenommen.
4. Die Sedimente enthalten zu je etwa 50 % Kernmaterial und Zellwände. Der Zytoplasmaanteil ist kleiner als 2 %. Mit Hilfe der Ultrazentrifuge kann letzterer praktisch eliminiert werden.
Die Eignung dieser Kernsedimente zu chemischen Analysen wird diskutiert.
5. Konzentrierte RZ-Lösung wirkt als Isolierungsmedium folgendermaßen:
 - Es werden weniger Kerne mechanisch geschädigt als in verdünnten Lösungen.
 - Die Lösungsgeschwindigkeit von RNS ist gegenüber verdünnten Lösungen stark herabgesetzt.
 - Das durchschnittliche Volumen der isolierten Kerne beträgt bloß ein Drittel desjenigen von Kernen in frischen Wurzelschnitten.
6. Wirkung eines Zusatzes von 0,002 *m* CaCl₂ zum RZ-Medium:
 - Die Agglutination von Zellteilchen im Homogenat wird gefördert, wodurch mehr Zytoplasma ins Sediment gelangt.
 - Die Lösungsgeschwindigkeit von RNS wird gegenüber reiner RZ-Lösung um die Hälfte herabgesetzt.
 - Noch stärkere Kernvolumenkontraktion als in reinem konzentriertem RZ-Medium.
7. Aus dem Verhalten der Kerne beim Zentrifugieren geht eine ungewöhnlich hohe Dichte (etwa 1,3) der nach dem beschriebenen Verfahren behandelten Kerne hervor.

Es wird angenommen, daß die Kerne in reiner konzentrierter RZ-Lösung, *pH* 5,5, durch Wasserentzug entquellen, wodurch das Kernvolumen verkleinert und die Kerndichte erhöht wird.

Diese Arbeit entstand unter der Leitung der Herren Prof. Dr. A. Frey-Wyssling und Prof. Dr. F. Ruch am Institut für allgemeine Botanik der ETH. Sie wurde aus Mitteln des Schweizerischen Nationalfonds finanziert, die ich hiermit angelegentlichst verdanken möchte. Für vielseitige Anregung und Unterstützung dieser Arbeit bin ich meinen Lehrern zu großem Dank verpflichtet.

Für Beratung und Mithilfe bei speziellen Problemen danke ich den Herren Prof. Dr. K. Mühlethaler, Prof. Dr. A. Linder (statistische Auswertung), Dr. W. Stäubli, Frl. H. Hengartner, dipl. Naturwiss., und Frl. A. Rechsteiner (elektronenmikroskopische Präparation).

Literatur

1. Albert E., Felix K. (1955): Über die Kerne der Ganglien- und Gliazellen und ihre Veränderungen in Rohrzuckerlösungen. *Exptl. Cell Research* **8**, 523.
2. Albright J. F., Anderson N. G. (1958): A method for rapid fractionation of particulate systems by gradient differential centrifugation. *Exptl. Cell Research* **15**, 271.
3. Allfrey V., Stern H., Mirsky A. E., Saetren H. (1952): The isolation of cell nuclei in non aqueous media. *J. Gen. Physiol.* **35**, 529.
4. Anderson N.G. (1953a): Studies on isolated cell components, V. The effects of various solutions on the nuclear envelope of the isolated rat liver nucleus. *Exptl. Cell Research* **4**, 306.
5. — (1953b): Studies on isolated cell components, VI. The effects of nucleases and proteases on rat liver nuclei. *Exptl. Cell Research* **5**, 361.
6. — (1955a): Studies on isolated cell components, VII. A reexamination of the preparation and properties of rat liver homogenates. *Exptl. Cell Research* **8**, 91.
7. — (1955b): Studies on isolated cell components, VIII. High resolution gradient differential centrifugation. *Exptl. Cell Research* **9**, 446.
8. — (1956): A note on «homogenizers» for tissue brei preparation. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* **2**, 219.
9. Anderson N. G., Wilbur K. M. (1952): Studies on isolated cell components, IV. The effect of various solutions on the isolated rat liver nucleus. *J. Gen. Physiol.* **35**, 781.
10. Battin W. T. (1959): The osmotic properties of nuclei isolated from amphibian oocytes. *Exptl. Cell Research* **17**, 59.
11. Behrens M. (1935): Zitiert in: Milovidov P.F., Physik und Chemie des Zellkerns (Protoplasma-Monographien, 20. Bd., Berlin 1949, Bornträger), S. 66.
12. — (1956): Gewinnung morphologischer Zellen- und Gewebestandteile in nicht-wässrigem Milieu. In: Rauen M., Biochem. Taschenbuch (Berlin, Springer), S.910.
13. Brachet J. (1957): *Biochemical Cytology* (New York, Academic Press).
14. Brown R. (1951): Isolation of nuclei from plant cells. *Nature* **168**, 941.
15. Chargaff E. (1955): Isolation and composition of the deoxyribose nucleic acids and of the corresponding nucleoproteins. In: Chargaff E. & Davidson J. N. *The Nucleic Acids* (New York, Academic Press), Vol. I, 307.
16. Chauveau J., Moulé Y., Rouiller Ch. (1956): Isolation of pure and unaltered liver nuclei. Morphology and biochemical composition. *Exptl. Cell Research* **11**, 317.
17. — (1957): Technique d'isolement des noyaux cellulaires basée sur leur densité. *Bull. Soc. Chim. biol.* **39**, 1521.
18. Chayen J. (1949): Squash preparations of living root-tip cells. *Nature* **164**, 930.
19. — (1952): Pectinase technique for isolating plant cells. *Nature* **170**, 1071.
20. Cutter V., Wilson K., Dubé G. (1952): The isolation of living nuclei from the endosperm of *Cocos nucifera*. *Science* **115**, 58.
21. Dallam R.D. (1955): Studies on the chemical composition of nuclei and cytoplasmic granules. *Arch. Biochem. Biophys.* **54**, 24.
22. Dounce A.L. (1955): Isolation and composition of nuclei and nucleoli. In: Chargaff E. & Davidson J. N. *The Nucleic Acids* (New York 1955, Academic Press), Vol. II, 93.
23. Dounce A. L., Witter R.F., Monty K.J., Pate S., Cottone M. A. (1955): A method for isolating intact mitochondria and nuclei from the same homogenate, and the influence of mitochondrial destruction on the properties of cell nuclei. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* **1**, 139.
24. Feulgen R., Behrens M., Mahdihassan S. (1937): Darstellung und Identifizierung der in den pflanzlichen Zellkernen vorkommenden Nucleinsäure. *Z. physiol. Ch.* **246**, 203.

25. Frey-Wyssling A. (1959): Die pflanzliche Zellwand (Berlin, Springer), S. 232.
26. Haitinger M. (1938): Fluoreszenzmikroskopie (Leipzig, Akad. Verlagsgesellschaft m.b.H.).
27. Handbook of Chemistry and Physics, 1949, 31st ed. (Cleveland, Chemical Rubber Publishing Co.), S. 1068.
28. Hennig A. (1957): Das Problem der Kernmessung. Eine Zusammenfassung und Erweiterung der mikroskopischen Meßtechnik. *Mikroskopie* **12**, 174.
29. — (1958): Kritische Betrachtungen zur Volumen- und Oberflächenmessung in der Mikroskopie. *Zeiss Werkzeitschrift* **6**, 78.
30. Hermans P.H. (1949): Physics and Chemistry of Cellulose Fibers (New York und Amsterdam, Elsevier), S. 198.
31. Hogeboom G.H., Schneider W.C., Striebach M.J. (1952): Cytochemical studies, V. On the isolation and biochemical properties of liver cell nuclei. *J. Biol. Chem.* **196**, 111.
32. Hogeboom G.H., Schneider W.C. (1955): The cytoplasm. In: Chargaff E. & Davidson J. N. *The Nucleic Acids* (New York, Academic Press). Vol. II, 199.
33. Holter H., Ottesen M., Weber R. (1953): Separation of cytoplasmic particles by centrifugation in a density-gradient. *Experientia* **9**, 347.
34. Holtfreter J. (1954): Observations on the physicochemical properties of isolated nuclei. *Exptl. Cell Research* **7**, 95.
- 34a. Jagendorf A. T., Wildman S.G. (1954): The proteins of green leaves. VI. Centrifugal fractionation of tobacco leaf homogenates and some properties of isolated chloroplasts. *Plant Physiol.* **29**, 270.
35. Johnston F.B., Nasatir M., Stern H. (1957): The isolation of nuclei and oxidative particles from viable wheat embryos. *Plant Physiol.* **32**, 124.
36. — Setterfield G., Stern H. (1959): The isolation of nucleoli from ungerminated pea embryos. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* **6**, 53.
37. Kamphausen H., Morton R. K. (1956): A simply constructed tissue homogenizer. *Biochem. J.* **63**, 647.
38. Kay E.R.M., Davidson J.N. (1955): Acid-soluble nucleotide derivatives in cell nuclei isolated in a non-aqueous medium. *Experientia* **11**, 439.
39. Kessler G. (1958): Zur Charakterisierung der Siebröhrenkallose. *Ber. Schweiz. Bot. Ges.* **68**, 5.
40. Lang K., Siebert G. (1952): Untersuchungen über Stoffwechselprozesse in isolierten Zellkernen. 6. Mitt.: Methodik der Gewinnung reiner intakter Zellkerne in beliebigem Maßstab. *Biochem. Z.* **322**, 360.
41. Lauber H. (1947): Untersuchungen über das Wachstum der Früchte einiger Angiospermen unter endomitotischer Polyploidisierung. *Österr. Bot. Z.* **94**, 30.
42. Linder A. (1951): Statistische Methoden für Naturwissenschaftler, Mediziner und Ingenieure. 2. A. (Basel, Birkhäuser).
43. Mazia D. (1952): Zitiert in: Dounce A. L., 1955.
44. McLean J. D. (1957): Thesis; Univ. of Sydney, Austral.
45. Ottesen M., Weber R. (1956): Density-gradient centrifugation as a mean of separating cytoplasmic particles. *C. R. Labor. Carlsberg* (Danmark), série chimique **25**, 417.
46. Pfeiffer H. (1935): Anwendung der Schwebemethode zur Bestimmung des spezifischen Gewichts isolierter Zellkerne. *Protoplasma* **22**, 593.
47. Philpot J.St.L., Stanier J.E. (1956): The choice of the suspension medium for rat liver cell nuclei. *Biochem. J.* **63**, 214.
48. Poort C. (1957): A new homogenizer for the isolation of nuclei in concentrated glycerine. *Biochim. Biophys. Acta* **25**, 32.
49. Potter P.R., Elvehjem C.A. (1936): A modified method for the study of tissue oxydations. *J. Biol. Chem.* **114**, 495.

50. Schneider R. M. (1955): The effect of anions on the optical properties of rat liver nuclei isolated in glycerol solutions. *Exptl. Cell Research* **8**, 24.
51. Schneider R. M., Peterman M. L. (1950): Nuclei from normal and leucemic mouse spleen. *Cancer Research* **10**, 751.
52. Siebert G. (1956): Fraktionierung tierischer Gewebe in wäßrigen Medien. In: Rauen M., *Biochem. Taschenbuch* (Berlin, Springer), S. 904.
53. Smellie R. M. S., Humphrey G. F., Kay E. R. M., Davidson J. N. (1955): The incorporation of radioactive phosphorus into the nucleic acids of different rabbit tissues. *Biochem. J.* **60**, 177.
54. Stern H., Mirsky A. E. (1952): The isolation of wheat germ nuclei and some aspects of their glycolytic metabolism. *J. Gen. Physiol.* **36**, 181.
- 54a. Strugger S. (1926): Zitiert in: Milovidov P. F., *Physik und Chemie des Zellkerns* (Protoplasma-Monographien, 20. Bd., Berlin 1949, Bornträger), S. 161.
55. Wilbur K. M., Anderson N. G. (1951): Studies on isolated cell components, I. Nuclear isolation by differential centrifugation. *Exptl. Cell Research* **2**, 47.
56. Yamaha G., Ishii T. (1933): Über die H-Ionen-Konzentration und die isoelektrische Reaktion der pflanzlichen Protoplasten, insbesondere des Zellkerns und der Plastiden. *Protoplasma* **19**, 194.