

Ein Cartesianischer Submikroliterstaucher, in dem gemischt werden kann

Mixing of Solutions in a Cartesian Submicroliter-Diver

W. BECKER

Zoologisches Institut der Universität Hamburg

(Z. Naturforsch. 28 c, 169–172 [1973]; eingegangen am 7. November / 8. Dezember 1972)

Cartesian submicroliter-diver, mixing

A method is described of mixing solutions in a cartesian submicroliter-diver with a gas volume of about $0.2 \mu\text{l}$. The solutions are mixed within about 10 sec. Approximately 1-2 min after interruption of the experiments the readings are resumed.

Einleitung

Die Entwicklung des Ampullentauchers durch ZEUTHEN¹ hat die Erfassung von Gasstoffwechselraten in der Größenordnung von $10^{-4} \mu\text{l}/\text{Stde.}$ ermöglicht. Viele der Untersuchungen, die ursprünglich im Standard- oder Mikroliterstaucher²⁻⁵ u. a. durchgeführt wurden, ließen sich auch auf den Ampullentaucher als Submikroliterstaucher mit seiner hohen Empfindlichkeit und relativ einfachen Handhabung übertragen. Im Gegensatz zu den Verhältnissen beim Standardtaucher ist es jedoch beim Ampullentaucher schwierig, während eines Versuches Flüssigkeiten im Taucher zu mischen. Das ist jedoch unumgänglich, wenn man die Wirkung von Substraten oder Inhibitoren auf Gasumsetzungen an biologischem Material in der oben angegebenen Größenordnung erfassen will. In der vorliegenden Arbeit soll eine Methode beschrieben werden, mit der ohne nennenswerte Versuchsunterbrechung in einem Ampullentaucher von etwa $0.5 \mu\text{l}$ Gesamtvolumen gemischt werden kann.

Herstellung des Tauchers

Der Taucher (Abb. 1) besteht aus einer zylindrischen Glaskapillare von 10-15 mm Länge, einem Innendurchmesser von 0,2 bis 0,25 mm und einer Wandstärke zwischen 0,01 mm und 0,02 mm. Die Schwanzlänge beträgt durchschnittlich 10 mm. Es ergibt sich so ein Gesamtvolumen des Tauchers um $0,5 \mu\text{l}$. Ist der Taucher beschickt und schwimmt er im Flotationsmedium, beträgt das eingeschlossene Gasvolumen etwa $0,2 \mu\text{l}$.

Sonderdruckanforderungen an Prof. Dr. W. BECKER,
D-2000 Hamburg 13, Papendamm 3.

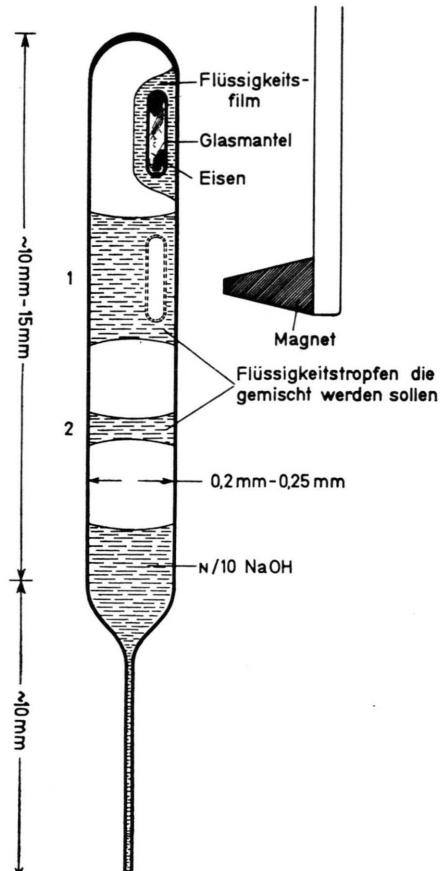


Abb. 1. Schematische Darstellung des Tauchers. Nähere Erklärungen siehe Text.

Da mir keine Glasröhren mit Wandstärken zur Verfügung stehen, aus denen die benötigten dünnwandigen Kapillaren gezogen werden können, dienen dickwandige Thermometerkapillaren (AR-Glas, innerer Durchmesser 0,3 mm, äußerer Durchmesser



Dieses Werk wurde im Jahr 2013 vom Verlag Zeitschrift für Naturforschung in Zusammenarbeit mit der Max-Planck-Gesellschaft zur Förderung der Wissenschaften e.V. digitalisiert und unter folgender Lizenz veröffentlicht: Creative Commons Namensnennung-Keine Bearbeitung 3.0 Deutschland Lizenz.

Zum 01.01.2015 ist eine Anpassung der Lizenzbedingungen (Entfall der Creative Commons Lizenzbedingung „Keine Bearbeitung“) beabsichtigt, um eine Nachnutzung auch im Rahmen zukünftiger wissenschaftlicher Nutzungsformen zu ermöglichen.

This work has been digitized and published in 2013 by Verlag Zeitschrift für Naturforschung in cooperation with the Max Planck Society for the Advancement of Science under a Creative Commons Attribution-NoDerivs 3.0 Germany License.

On 01.01.2015 it is planned to change the License Conditions (the removal of the Creative Commons License condition "no derivative works"). This is to allow reuse in the area of future scientific usage.

2,5 mm) als Ausgangsmaterial. Sie werden zunächst an einer Stelle zu einer Kugel aufgeblasen, aus der dann die für den Taucher benötigte Kapillare gezogen wird. Entsprechend der Größe der Kugel lässt sich die Wandstärke der Kapillare variieren. Bei brauchbaren Taucherkapillaren ist die Wandstärke so bemessen, daß der Taucher, zur Hälfte mit Flüssigkeit gefüllt und zusätzlich mit dem Eisenstäbchen versehen (s. u.), in N/10 NaOH schwebt.

Die Herstellung des Tauchers entspricht der eines normalen Ampullentauchers¹ mit dem Unterschied, daß Halsstück und Ampulle gleichen Durchmesser haben und nicht voneinander abgesetzt sind. Beim Beschicken wird der Taucher, wie üblich, zunächst als Pipette benutzt. Nacheinander werden, durch eine kleine Luftblase voneinander getrennt, die beiden während des Versuches zu mischenden Flüssigkeiten in den Taucher aufgenommen. Das Versuchsobjekt befindet sich hierbei in Tropfen 2 (Abb. 1). In Tropfen 1 wird das mit Glas überzogene Eisenstäbchen eingebracht. Anschließend werden beide Tropfen soweit zum Taucherschwanz hin hochgesogen, daß der Taucherhals zugeschmolzen werden kann. Um dabei eine Erwärmung der Tropfen zu vermeiden, legt man am besten einen schmalen Deckglassplitter in einem Tropfen destillierten Wassers auf den Taucherhals auf. Er behindert die Beobachtung des Materials während des Zusammensetzens nicht.

Das Stäbchen, mit dem gemischt wird, besteht aus einem Eisenkern (0,3-0,5 mm lang, Durchmesser 0,08 bis 0,12 mm), der mit Glas überzogen ist. Die Herstellung ist in Abb. 3 dargestellt. Für die spätere Berechnung des Gasumsatzes ist es nötig, die durch das Rührstäbchen eingebrachte zusätzliche Masse zu berücksichtigen. Im Vergleich zu einem Taucher ohne Rührstäbchen muß der hier geschilderte Taucher, wenn er schwebt, ein geringfügig größeres Gasvolumen aufweisen.

Vor Versuchsbeginn wird das Eisenstäbchen mit einem Magneten aus dem Tropfen 1 in den Gasraum oberhalb dieses Tropfens geschoben. Er haftet durch Adhäsion an der Wand und steht mit dem Tropfen 1 nicht mehr in Verbindung (Abb. 1). So ist gewährleistet, daß keine Deformation des Menisken erfolgt. Im Hinblick auf die für die Einstellung der Taucher nötige freie Beweglichkeit der Menisken ist dies wünschenswert. Anschließend bringt man den Taucher in üblicher Weise¹ zum Schweben und überführt ihn dann in das Flotationsgefäß, das möglichst an ein empfindliches Manometer^{1,6} angeschlossen wird.

Versuchsdurchführung

Bau und Anordnung des Flotationsgefäßes sind aus Abb. 2 zu ersehen. Es befindet sich am unteren Ende einer zylindrischen Glaskammer. (Sie weist ein Volu-

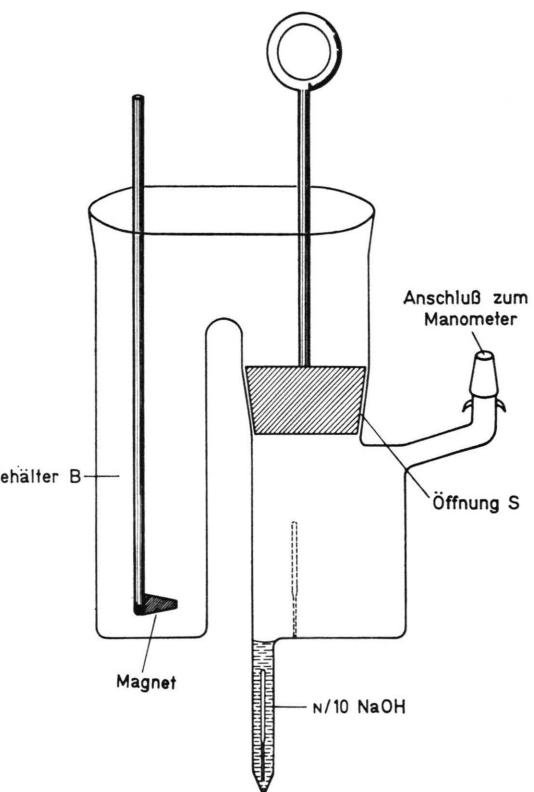


Abb. 2. Flotationsgefäß mit Ansatzteilen. Nähere Erklärungen siehe Text.

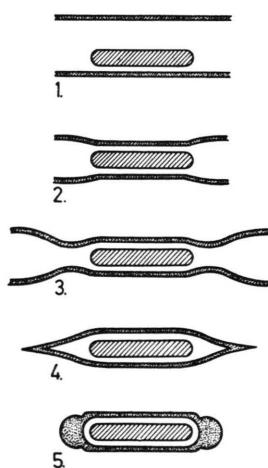


Abb. 3. Schema zur Herstellung des Mischstäbchens. Nähere Erklärungen siehe Text.

men von etwa 100 ml auf, wenn das Manometer nach Zeuthen¹ verwendet werden soll). Über eine Öffnung S (Schliff 29/31) kann das Flotationsgefäß beschickt werden. Ein Ansatzstutzen an der Glaskammer führt zum Manometer, während der zusätzliche Behälter B zur Aufnahme eines Magneten dient. Bei einer Versuchsdurchführung werden, nach einer gewissen Zeit der Temperaturadaption, zunächst die Änderungen des Ausgleichsdruckes bestimmt, solange sich das Versuchsobjekt im Medium des Tropfen 2 befindet. Dann erfolgt die Zumischung des Mediums in Tropfen 1. Zu diesem Zwecke wird der Taucher mit einer Pinzette⁵ aus dem Flotationsmedium genommen und mit der ihm anhaftenden Flüssigkeit an die Innenwand der Glaskammer angelegt. Er haftet durch Adhäsion. Über die Öffnung S kann der Magnet an einer Halterung, die wiederum an einem Feintribefestigt ist, eingebracht werden. Mit diesem Magneten lässt sich in einfacher Weise das Rührstäbchen in den Tropfen 1 einbringen und von dort in Tropfen 2 weiterschieben. Durch mehrmaliges Auf- und Abbewegen des Stäbchens können beide Flüssigkeitstropfen gut und vor allem innerhalb von etwa 10 sec gemischt werden. Die zwischen beiden Tropfen liegende Luftblase wird mit dem Eisenstäbchen in den unteren oder oberen Gasraum geschoben. Es lässt sich dies am einfachsten durchführen, wenn der Durchmesser des Stäbchens die Hälfte bis zwei Drittel des inneren Taucher durchmessers ausmacht. Ist der Durchmesser größer, wird zuviel Flüssigkeit mitgeschleppt, die dann im Gasraum zu zusätzlichen Flüssigkeitstropfen zusammenfließt. Ist er kleiner, kann die zwischen den Tropfen sich befindende Luftblase nicht bewegt werden.

Nach dem Mischen wird das Eisenstäbchen aus dem nun einzigen Tropfen nach oben in den Gasraum des Taucherhalses gebracht und der Taucher in das Flotationsmedium zurückgeschoben. Ein neuer Ausgleichsdruck wird eingestellt und der Versuch kann fortgesetzt werden.

Während des Mischens bleibt der Taucher auf der gleichen Temperatur, die er auch vorher im Flotationsmedium angenommen hat, da die Glaskammer völlig in das Wasserbad eintaucht. Damit über den Magneten und die Pinzette, die beide in die Glaskammer eingebracht werden müssen, der Taucher nicht in seiner Temperatur verändert wird, befinden sich diese seit Versuchsbeginn in dem Behälter B. Sie werden somit ebenfalls über das Wasserbad temperiert. Ein hoher Kragen, der Behälter B und Schliffansatz umschließt verhindert, daß sie beim Einbringen in die Glaskammer den durch das Wasserbad temperierten Raum verlassen.

Alle diese Vorkehrungen ermöglichen es, nach dem Mischen sofort mit dem Versuch weiterzufahren, ohne eine erneute Temperaturadaption abwarten zu müssen. An Hand von Kontrollversuchen nach dem oben geschilderten Verfahren, aber ohne Versuchsobjekte, ließ sich dies feststellen. So ist aus Abb. 4 zu ersehen, daß die Auftriebsänderungen des Kontrolltauchers pro Zeiteinheit auch nach dem Mischen der Tropfen und der Fortsetzung des Versuches konstant geblieben sind.

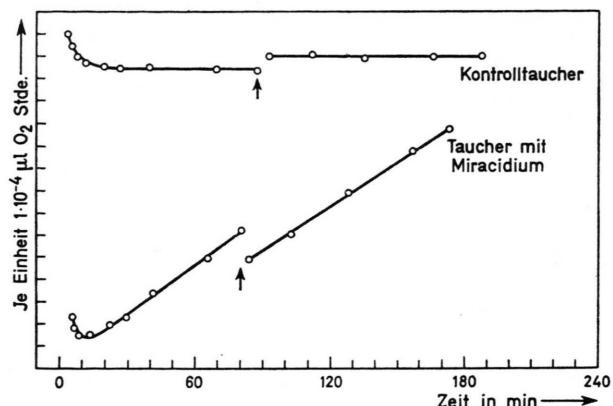


Abb. 4. Sauerstoffverbrauch eines Miracidiums von *Schistosoma mansoni* in destilliertem Wasser vor und in physiologischer Kochsalzlösung (0,9%) nach dem Mischvorgang. Der Kontrolltaucher ist mit eingezeichnet. Der Pfeil zeigt den Zeitpunkt an, an dem gemischt wurde.

Eine Anpassungsphase, innerhalb der erst Linearität erreicht werden müßte, ist nicht vorhanden. Die praktisch unvermeidbare Parallelverschiebung beider Kurven, die für die Auswertbarkeit des Versuches keine Bedeutung hat, röhrt von der während des Versuches nötigen (s. o.) Neueinstellung des Tauchers her.

Diskussion

Das Problem, in einem Ampullentaucher während des Versuches zu mischen, ist schon von HAMBERGER u. TENGROTH⁷ und von CHAKRAVARTY⁸ behandelt worden. CHAKRAVARTY hat die Methode, mit der im allgemeinen Flüssigkeiten im Standardtaucher gemischt werden, auf den Ampullentaucher übertragen. Durch kurzfristigen Überdruck läßt er zwei Tropfen, wobei einer ein Seitentropfen ist, zusammenfließen. Die von ihm verwendeten Taucher haben allerdings Gasvolumina um 10 μl , so daß gerade der besondere Vorteil des Ampullentauchers, seine hohe Empfindlichkeit bei Gasvolumina unter 1 μl , verlorengeht. HAMBERGER & TENGROTH bringen die einzumischende Flüssigkeit in versiegelten Kapillaren in den Taucher. Durch den kurzen Impuls eines scharf gebündelten Laserstrahles wird die Kapillare zerbrochen und ihr Inhalt kann in das Medium mit dem Versuchsobjekt diffundieren. Zwar können hier relativ kleine und damit auch empfindliche Taucher verwendet werden (die Autoren geben ein Trockengewicht der Taucher von 1-2 mg an), ein Nachteil dieser Methode liegt aber meines Erachtens darin, daß erhebliche Zeit verstreichen muß, ehe der zuzumischende Stoff aus der nur 20 μ starken

Kapillare in die Flüssigkeit diffundiert und sich dort gleichmäßig verteilt. Werden schnell bewegliche Objekte untersucht, besteht weiterhin die Gefahr, daß sie vom Laserstrahl getroffen und beschädigt oder getötet werden. Vor allem wenn im Taucher nicht nur ein Organismus untersucht wird, sondern sich mehrere gemeinsam bewegen, darf dies nicht unterschätzt werden.

Die Verwendung des von mir in der hier vorliegenden Arbeit geschilderten Tauchers vermag die Nachteile sowohl der Methode nach CHAKRAVARTY als auch der nach HAMBERGER & TENGROTH, auszuschalten. Der Taucher kann ein echter Submikroliteraucher mit einem Gasvolumen von 0,2 μl und einer dementsprechend hohen Empfindlichkeit sein. Die Zumi schung einer Flüssigkeit ist innerhalb von wenigen Sekunden abgeschlossen. Untersuchungen an Eiern und Miracidien von *Schistosoma mansoni* haben darüber hinaus gezeigt, daß keine Beeinträchtigung der Organismen durch den Mischvorgang erfolgt.

Ein Nachteil gegenüber den schon bekannten Methoden mag im Einzelfall die erforderliche Neueinstellung des Tauchers nach dem Mischen der Flüssigkeiten sein. Ganz allgemein muß wohl für eine exakte Bestimmung des Ausgleichsdruckes bei allen bekannten manometrischen Methoden mit etwa 2-3 min gerechnet werden. Der zusätzliche Zeitaufwand für die Neuein-

stellung des Tauchers nach dem Mischvorgang kann mit 1-2 min veranschlagt werden. Er wird in den meisten Fällen keine Rolle spielen. Sollte das doch einmal der Fall sein, so kann wohl durch die Verwendung entsprechend starker Magnetfelder durch die Glaswand des Flotationsgefäßes hindurch gemischt werden. Der Taucher müßte hierzu am Boden ruhen, um ein Widerlager zu haben, das Rührstäbchen könnte aus diesem Grunde nur von oben nach unten bewegt und müßte nach dem Mischen in den unteren Gasraum geschoben werden. Um eine möglichst gute Durchmischung zu erzielen, wäre die Verwendung eines Wechselstromelektromagneten wünschenswert, dessen Frequenz ein Rührstäbchen noch gut folgen kann.

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft danke ich sehr für die Unterstützung der Arbeit.

- ¹ E. ZEUTHEN, J. Embryol. Exptl. Morphol. **1**, 239 [1953].
- ² K. LINDERSTRÖM-LANG, Nature [London] **140**, 108 [1937].
- ³ K. LINDERSTRÖM-LANG u. D. GLICK, C. R. Trav. Lab. Carlsberg, Sér. chim. **22**, 300 [1937].
- ⁴ E. J. BOELL, J. NEEDHAM u. V. ROGERS, Proc. Roy. Soc. [London] Ser. B. **127**, 322 [1939].
- ⁵ H. HOLTER, C. R. Trav. Lab. Carlsberg, Sér. chim. **24**, 399 [1943].
- ⁶ W. BECKER, Z. Biol. **116**, 114 [1968].
- ⁷ HAMBERGER u. TENGROTH, Exp. Cell Res. **37**, 460 [1965].
- ⁸ N. CHAKRAVARTY, Exp. Cell Res. **47**, 278 [1967].