

Homogenisierung von zähen biologischen Sekreten oder Gewebeteilen

Tanja Butt

Retsch GmbH

Manchmal kann die Probenvorbereitung und Homogenisierung von biologischem Material ebenso zäh sein wie das Material selbst. So sind z. B. Gefäße wie die beliebten 2 ml single-use Gefäße von Eppendorf häufig nicht ausreichend, um die vollständige Probenmenge aufzunehmen. Das Material muss also aufgeteilt und später vereint werden, was einen zusätzlichen Arbeitsschritt bedeutet und gerade bei Routinearbeiten einen erheblichen zusätzlichen Zeitaufwand ausmacht. Es stehen zwar oft auch größere Mahlbecher, z.B. aus Stahl, zur Verfügung, die das Material vollständig aufnehmen können. Dieser Vorteil wird aber durch den notwendigen Reinigungsaufwand wieder relativiert. Die Lösung für derartige Problemstellungen bieten 5 ml single-use Tubes von Eppendorf, denn sie bieten mehr Volumen, müssen aber nach erfolgter Probenvorbereitung keiner aufwändigen Reinigung unterzogen werden. RETSCH bietet für die Schwingmühle MM 400 einen Adapter an, mit dem bis zu 6 x 5 ml Eppendorf Tubes zeitgleich eingesetzt werden können.

Die Beschaffenheit biologischer Proben kann sehr unterschiedlich sein, z. B. sehr zähes Sputum von Mukoviszidosepatienten oder Gewebeproben von Leber, Lunge oder Tumoren. Am Beispiel dieser Proben wird nachfolgend der Einsatz der MM 400 mit den neuen Adaptern für die 5 ml single-use Tubes zur Homogenisierung erläutert.

Homogenisierung von sehr zähem Sputum von Mukoviszidosepatienten

Das von Mukoviszidosepatienten abgehustete Sputum wird üblicherweise für die mikrobiologische Routinediagnostik, aber auch für Fragestellungen in der Forschung, homogenisiert. Die Homogenisierung lässt sich sehr gut in der Schwingmühle MM 400 durchführen, allerdings war bisher die Homogenisierung von mehr als 1 ml Sputum pro Patientenprobe nur unzureichend möglich. Alternativ wurde mit 2 ml Eppendorf Tubes gearbeitet, was zwar den Vorteil der minimierten Kontaminationsgefahr, jedoch den Nachteil des begrenzten Probenvolumens

bedeutet. Für die Probenaufbereitung in der Forschung wurde daher das sehr zähe und viskose Sputum in Portionen aufgeteilt und später wieder vereint, was bei teilweise infektiösem Material kein geeignetes Vorgehen darstellt. Eine andere Möglichkeit der Verarbeitung ist die Homogenisierung in 5 ml Stahlmahlbechern, wobei das Sputum nicht aufgeteilt werden musste, die Mahlbecher jedoch anschließend einer gründlichen Reinigung unterzogen wurden.

Frau Professor Kahl und Frau Deiwick vom Universitätsklinikum Münster untersuchen unter anderem Sputum von Mukoviszidosepatienten, die an chronisch rekurrenden Atemwegsinfektionen leiden. Der Forschungsschwerpunkt der AG Kahl besteht in der Untersuchung der Persistenz und Adaptation des wichtigen humanpathogenen Erregers *Staphylococcus aureus*, der aus den Atemwegen der Mukoviszidosepatienten nachgewiesen wird. Dazu wird das Sputum homogenisiert und für die Routinediagnostik sowie für weitere Fragestellungen wie Mikrobiom-, Proteom- und Metabolomuntersuchungen aliquotiert. Daher muss das Sputum möglichst homogen vorliegen, damit alle Untersuchungen mit vergleichbaren Proben durchgeführt werden können. Die Homogenisierung erfolgt in Münster mit der Schwingmühle MM 400 und dem Adapter für 5 ml Reaktionsgefäße. Je nach Viskosität des Sputums werden 500 bis maximal 3000 µl mit 2 - 3 Kugeln aus Zirkondioxid mit 5 mm Durchmesser bei 30 Hz für mindestens 1 min 30 sec bis maximal 2 min 30 sec

homogenisiert. Anschließend wird das Sputum für die unterschiedlichen Untersuchungsgänge aufgeteilt. Die Homogenisierung in der MM 400 liefert für die meisten Sputen gute Ergebnisse. Da mittels der 5 ml Reaktionsgefäße das gesamte Probenvolumen in einem Arbeitsgang homogenisiert wird, bedeutet die neue Größe des Gefäßes eine erfreuliche Erleichterung und Beschleunigung des Arbeitsvorganges, wobei gleichzeitig der Umgang mit dem potentiell infektiösen Material deutlich minimiert wird.

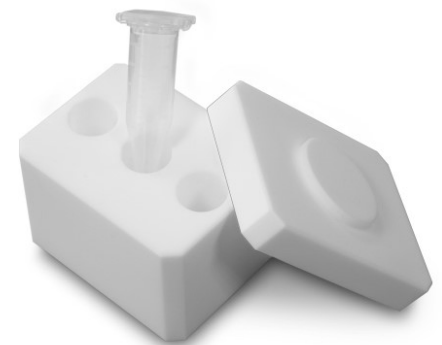


Abb. 1: Adapter für drei 5ml single-use Tubes

Homogenisierung von Lebergewebe

Gewebeproben wie Lunge, Leber oder Tumore werden z.B. in der biologischen Grundlagenforschung, Toxikologie, Biomedizin, Pharmakologie, Molekulardiagnostik und vielen weiteren Bereichen routinemäßig homogenisiert und untersucht. Auch hier erlebt der Anwender die gleichen Probleme wie bei der Homogenisierung von zähem

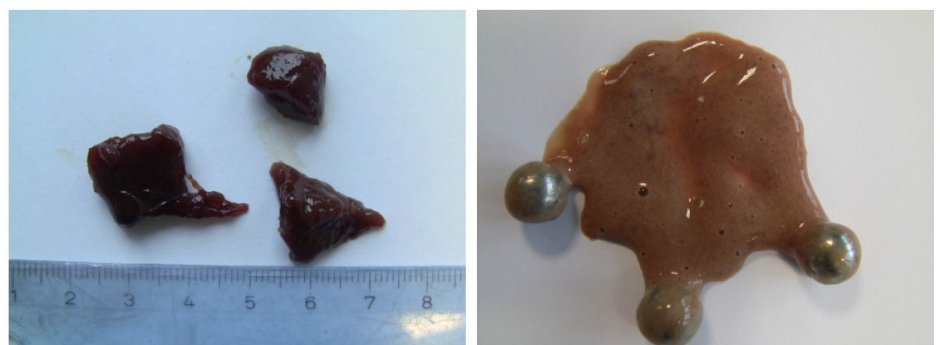


Abb. 2: Lebergewebe vor (links) und nach (rechts) der Homogenisierung

Sputum. Die Probenmenge ist oft zu groß für die klassischen 2 ml Reaktionsgefäße, also bleibt nur das Aufteilen und spätere Vereinen der Probe oder der Griff zu größeren Mahlbechern, die nach Gebrauch gereinigt und dekontaminiert werden müssen. Auch hier sind die 5 ml single-use Gefäße von Eppendorf in Kombination mit der Schwingmühle MM 400 eine ideale Alternative. Bis zu 6 Proben Leber werden auf diese Weise schnell und vollständig homogenisiert.

Für die Homogenisierung von Leber wurden verschiedenen Kombinationen von Kugelgröße, Kugelanzahl und Probenmenge getestet. Es stellte sich heraus, dass wenige größere Kugeln mit 10 mm Durchmesser einen wesentlich besseren Zerkleinerungseffekt auf die Gewebestruktur ausüben als viele kleinere Kugeln.

Zur vollständigen Homogenisierung von 3 - 5 g frischem Lebergewebe lieferte der Einsatz von drei 10 mm Stahlmahlkugeln die besten Ergebnisse. Das Reaktionsgefäß wurde mit einem wässrigen Puffer bis zur maximalen Fülllinie aufgefüllt. Die Probe wurde dann für 5 Minuten bei 30 Hz homogenisiert, so dass keinerlei Geweberückstände mehr zu erkennen waren.

Fazit

Mit dem Adapter für 5 ml Eppendorf-Tubes konnte die Palette der Anwendungsmöglichkeiten der Schwingmühle MM 400 erweitert werden. Probenmaterialien mit Volumen bis ca. 3 ml lassen sich in einem Schritt, ohne vorherige Aufteilung, in single-use Gefäßen homogenisieren. Die Extraktion von pulverisierten Proben direkt im Mahlgefäß stellt ebenfalls eine Erweiterung der Möglichkeiten dar. Lästige Zwischenschritte können entfallen, was den Arbeitsalltag in Labor erleichtert, und gleichzeitig die Qualität der Probenvorbereitung gewährleistet.

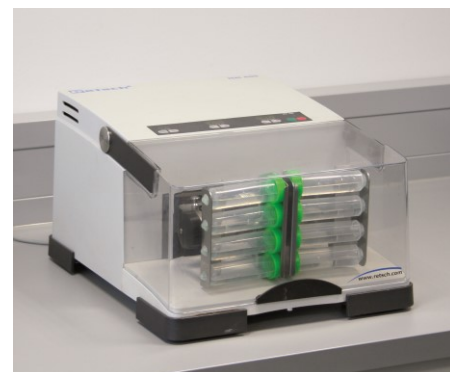


Abb.3: Schwingmühle MM 400 mit Adapter für 8 Falcon Tubes



Abb. 4: Zubehör für die Probenvorbereitung