D 339

Afdeling Cytogenetica

EEN ONDERZOEK NAAR DE DIFFERENTIELE KLEURING VAN ZUSTER CHROMATIDEN EN NAAR ZUSTERCHROMATIDE UITWISSELING IN CHROMOSOMEN VAN VICIA FABA

ja wat. uit.

Rijksuniversiteit Groningen
Biblio[illegible] Centrum
Kerkl[illegible] 14
[illegible] HAREN

Geert Alkema

1976
4 MNA

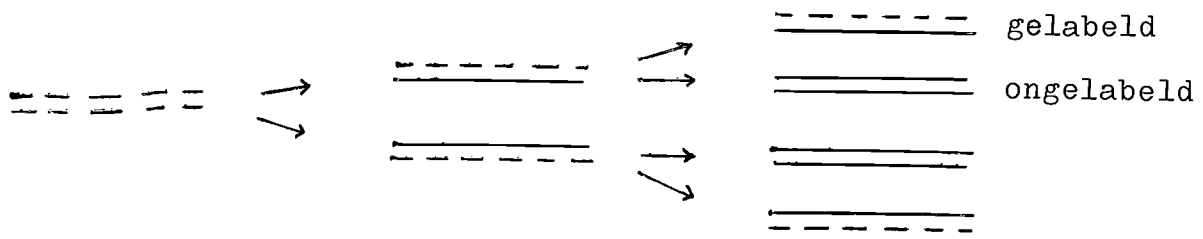
INHOUD

		BLZ.
I	INLEIDING	2
II	MATERIAAL EN METHODES	8
	A Kweekschema's Vicia faba	8
	B Incubatie media	12
	1 Volgens Kihlman	12
	2 De werking van de chemikaliën	13
	C Kleuringen en bijbehorende voor- en nabehandelingen	14
	1 Giemsa kleuring	14
	a Volgens Korenberg en Freedlender	14
	b Volgens Leiden	14
	c Eigen variatie	14
	d Idem	14
	e Variaties op Leiden	15
	f Idem	15
	g Volgens Wolff en Perry	15
	2 Thionine voorbehandeling bij de giemsa kleuring	16
	3 Acridine oranje kleuring en voorbehandeling voor een giemsa kleuring	17
	a Volgens Leiden	17
	b Volgens Pearse et al.	17
	c Eigen methode	17
	d Idem	18
	e Volgens Miller et al.	18
	f Eigen methode	18
	4 RNAse behandeling	19
	a Volgens Kihlman	19
	b Eigen methode	19
	c Idem doch RNAse opgelost in water	19
	D Maken van preparaten, maceratie	20
	a Maceratie in HCL	20
	b In pectinase	21
	c In pectinase, eigen methode	21
	d Idem	21

E Verdere behandelingen 22
a Nafixatie 22
b Veroudering 22
c Behandeling van wortels met DMSO 22
d Behandeling van de bonen met DMSO tijdens het weken 23
e Kleuring, behandeling enz. van hele worteltoppen 23
f Het kweken van bonen op de volgende stoffen 25
III RESULTATEN EN DISCUSSIE 26
A Giemsa kleuring TT/TB DNA 26
1 Volgens Korenberg en Freedlender 26
2 Volgens Leiden 26
3 Volgens eigen variatie 27
4 Volgens idem 28
5 Volgens variaties op Leiden 28
6 Volgens idem 29
7 Volgens Wolff en Perry 29
B Giemsa kleuring TB/BB DNA 30
1 t/m 7 30
C Thionine voorbehandeling bij de giemsa kleuring 31
D Acridine oranje kleuring als voorbereiding op een giemsa kleuring 32
E Discussie over de giemsa kleuring 33
F De acridine oranje kleuring 34
1 Volgens Leiden 34
2 Volgens eigen methode 34
3 Volgens Kihlman (RNAse behandeling) 35
4 Volgens eigen methode 36
5 Idem 37
6 Idem 38
7 Idem 38
8 Idem 39
G Discussie over de acridine oranje kleuring 40
H Algemene conclusies en opmerkingen 41
Literatuur 43

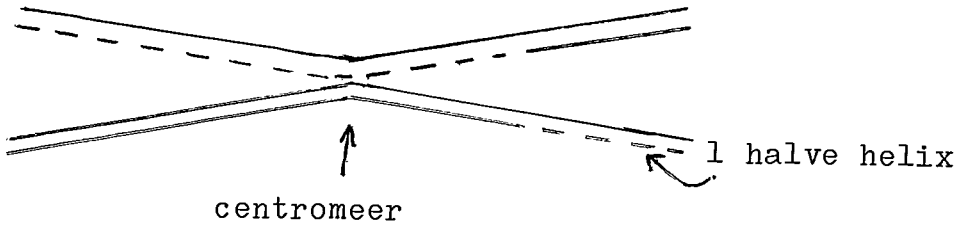
INLEIDING

Taylor (1956) liet chromosomen repliceren in aanwezigheid van tritium gelabeld thymidine. Hij volgde de aanwezigheid van het gelabeld thymidine in de volgende mitotische delingen in afwezigheid van de precursor.
Hij werkte met kiemwortels van Vicia faba.



gelabeld chromosoom, dat uit twee chromatiden bestaat	metafase 1 na de eerste replicatie	metafase 2 na de tweede replicatie

Na de eerste replicatie vond hij in de eerste metafaseplaten dat alle dochtercellen gelabelde chromosomen hadden.
Na de tweede deling in afwezigheid van ^{3}H-thymidine werden zowel ongelabelde als gelabelde chromosomen waargenomen.
Taylor verklaarde dit aan de hand van een monochromatisch chromosoommodel, waarbij elk chromosoom voor replicatie bestaat uit één enkele dubbele helix DNA draad.
Na de tweede replicatie was de helft van de chromosomen in de metafase niet gelabeld. Bij de gelabelde helft viel het Taylor op dat gedeelten van de zuster chromatiden tegen elkaar waren uitgewisseld. Op DNA niveau ziet het er als volgt uit:



Omdat er in de eerste metafase geen zusterchromatide uitwisseling was waargenomen concludeerde Taylor dat zuster chromatide uitwisseling (SCE's) het gevolg zijn van dubbele breuken in beide DNA ketens.

We kunnen nu de vraag stellen of SCE's altijd in de chromosomen aanwezig zijn, dus spontaan ontstaan, of dat ze het gevolg zijn van de technieken of daardoor beïnvloed worden.

Wolff 1964 schreef alle SCE's toe aan endogene straling van het tritium.
Marin en Prescott 1964 schreven SCE's toe aan spontane gebeurtenissen, niet in verband staande met door straling geïnduceerde chromosoombreuken.
De mogelijkheid bleef nog open dat het aantal uitwisselingsplaatsen gelimiteerd is in chromosomen en dat het aantal al zijn maximum heeft bereikt bij de laagste dosis tritium.
Later vonden Gibson en Prescott 1974 dat bij veel geringere dosis ^{3}H-thymidine de frequentie van de SCE's toch werd beïnvloed.

In 1973 ontwikkelde Latt een betere techniek ter detectie van de SCE's, een fluorescentietechniek.
Hierbij werden de cellen blootgesteld aan Broomdesoxyuridine (BrdU) een basenanaloog voor thymidine. Na twee replicatieronden in aanwezigheid van BrdU is het DNA van de ene chromatide dubbel gesubstitueerd met BrdU en de andere chromatide enkel gesubstitueerd met BrdU.
(In navolging van Korenberg en Freedlender 1974 wordt ongesubstitueerd DNA afgekort met TT, één DNA streng niet en de andere wel gesubstitueerd met BrdU met TB en dubbel gesubstistueerd met BB.
T= een streng die thymidine bevat,
B= een streng die BrdU bevat.)
Beide chromatiden kleuren verschillend met Hoechst 33258.
De reductie van de fluorescentie is evenredig met de hoeveelheid geïncorporeerde BrdU.
Ongesubstitueerde TT chromatiden fluoresceren goed, TB chromatiden fluoresceren matig en BB chromatiden fluoresceren zwak.

Kort na de ontdekking van Latt werd een differentiele fluorescentie na BrdU substitutie gerapporteerd voor de kleurstof acridine oranje door Kato 1974 (9), Perry en Wolff 1974 (18), Dutrillaux et al. 1974 en door Korenberg en Freedlander 1974.

De differentiele fluorescentie werd bekeken tussen TB en BB strengen DNA. Op deze wijze konden SCE's gemakkelijk bestudeerd en gescoord worden met een grote nauwkeurigheid.
Het nadeel van deze techniek is dat de fluorescentie vrij snel minder wordt en dat uitwisselingen aan het eind van de chromatiden niet goed kunnen worden bekeken. Dit komt door de sterke lichtuitstraling van de chromatide, als er nu aan het eind een minder sterk fluorescerend gedeelte zit, dan wordt dit niet goed gezien.

Met de ontwikkeling van de fluorescentie plus de giemsa kleuring ("FPG" techniek) door Perry en Wolff 1974 konden de nadelen van de fluorescentie techniek vermeden worden zonder iets van de voordelen te verliezen.
Ze vonden dat de met "hoechst" behandelde preparaten gekleurd konden worden met Giemsa. De chromatiden die zwak fluoresceerden (BB) werden licht gekleurd door de Giemsa, terwijl die met een heldere fluorescentie (TB) donker gekleurd werden.
Later hebben Korenberg en Friedlander 1974 gemeld dat een uitstekende differentiele giemsa kleuring verkregen kan worden zonder een voorafgaande fluorescentiekleuring, als de preparaten een hittebehandeling ondergaan voor de giemsa kleuring.

Goto et al. 1975 hebben de essentiële stappen nagegaan in de FPG techniek. De hoechst kleurstof kon gemakkelijk vervangen worden door andere metachromatische kleurstoffen zoals: thionine, methyleen blauw, acridine oranje en toluidine blauw O.
Ook de hitteperiode van twee uur in 2x SSC kon vermeden worden. Dit is ook vermeld door andere onderzoekers als Zakharov en Egolina, Ikushima en Wolff, Kim (uit 7), 1975.
Belangrijk is de kleuring met een metachromatische kleurstof, dan blootstelling aan licht (zonlicht gedurende drie uur is het beste) en vervolgens een giemsa kleuring.

Met behulp van deze nieuwe technieken zijn er enkele belangrijke verbeteringen op te merken ten opzichte van de autoradiografische methode. B.v. differentiele kleuring biedt de mogelijkheid om zeer kleine uitwisselingen tussen de chromatiden waar te nemen; alle chromosomen in een cel kunnen bekeken worden. Toch zijn de nieuwe technieken niet in staat gebleken om de vraag te beantwoorden of SCE's spontaan ontstaan of dat ze geïnduceerd worden.
Volgens Kato, Latt en Wolff en Perry 1974 is de frequentie van de SCE's afhankelijk van de concentratie van de BrdU.
De frequentie van SCE's in BrdU bevattende chromosomen wordt verdubbeld als de cellen worden blootgesteld aan licht, Wolff en Perry 1974 . Ook is waargenomen dat cellen die in aanwezigheid van BrdU groeien een hogere frequentie van chromosomale aberaties hebben dan cellen die in een normaal medium groeien.

Het mechanisme van de kleuring.

Hierover is nog niets met zekerheid te zeggen.
Latt vond in 1973 dat de fluorescentie dfficientie van hoechst 33258 gebonden aan poly dA dT vijf maal zo groot is als de fluorescentie efficientie van de kleurstof gebonden aan poly dA-dBrdU. Dit in verband met de verminderde fluorescentie van chromatiden die BrdU in hun DNA hebben geïncorporeerd.
Zakharov en Egolina 1972 veronderstelden dat BrdU fysisch-chemisch het DNA verandert, zodat het minder goed in de cellen eiwitten kan laten maken die gecondenseerd aan de chromosomen komen te zitten. Hierdoor zou er een verschillende spiralisatie van het DNA ontstaan.
Goto et al.1975 beweren dat de opname van metachromatische kleurstoffen van zwak fluorescerende chromatiden minder goed verloopt als dit gestimuleerd wordt door blootstelling aan sterk licht.
De verschillende spiralisatie verklaard volgens Zakharov en Egolina de differentiele giemsa kleuring.
Ikushima en Wolff 1974 overwogen Latt's hypothese en concludeerden dat deze hypothese niet in staat was om te verklaren hoe er dan een differentiele giemsa kleuring zou kunnen ontstaan. Zij verklaarden dit door een verschillende binding van de ei-

witten aan het DNA te veronderstellen; dit zou dan de differentiele giemsa kleuring veroorzaken.
Regan 1971 vond dat DNA, dat BrdU bevat, onderhevig is aan fotolyse; bovendien veroorzaakte een hoge concentratie van BrdU in het DNA uit zich zelf afwijkende spiralisatie van de chromatiden.
Volgens Goto 1975 is de belangrijkste reden voor differentiele kleuring de fotolyse van het DNA dat BrdU bevat.

Het doel van het onderzoek.

Het kijken bij Vicia faba met makkelijk toepasbare methodes naar differentiele fluorescentie en kleuring van de zuster chromatiden, daarna zullen de SCE's onderzocht worden.
Door de simpelheid en de snelheid van de methodes, aangegeven in de literatuur, zouden deze methodes gemakkelijker kunnen worden toegepast bij de screening van stoffen op een carcinogene of mutagene werking. Deze stoffen blijken een sterke toename van het aantal SCE's teweeg te brengen.
Een verbeterde gevoeligheid van de methodes zou meer licht kunnen werpen op het verschijnsel van de "spontane" zusterchromatide uitwisseling.

De redenen waarom er bij dit onderzoek gebruik is gemaakt van Vicia faba zijn de volgende (uit Kihlman 1975):

1, Het hele jaar door is het makkelijk te verkrijgen en te kweken. Het materiaal is goedkoop en de methodes vereisen geen steriele condities of enig duur materiaal of apparaat.
2, Het wortelmeristeem bevat een groot gedeelte aan cellen die met de mitose bezig zijn; het chromosoomaantal is laag (2n = 12) en de chromosomen zijn groot. Om een vergelijking te maken met Chinese hamstercellen of menselijke cellen die ook wel voor dit soort onderzoek gebruikt worden, kan de hoeveelheid DNA in pg. worden uitgedrukt. Een diploïde worteltop cel van Vicia faba bevat 46 pg. DNA, verdeeld

over 12 chromosomen; een Chinese hamstercel 8,3 pg. verdeeld over 22 chromosomen, en een menselijke cel 7,3 pg. verdeeld over 46 chromosomen.

3, Worteltoppen in vitro hebben een erg lage frequentie voor spontane aberaties en een stabiel chromosoomaantal, ze reageren ook normaler op behandelingen. Weefselkweken zijn erg gevoelig voor veranderingen in hun omgeving en kunnen gemakkelijk hun chromosomen laten fragmenteren door de werking van chemikaliën, terwijl dit laatste b.v. niet zou gebeuren in vivo.

Nadelen:

1, De celwand; deze kan een belemmering vormen voor biochemische en cytologische studies. Om het toch te gebruiken zijn er chemikaliën nodig die de celwanden aantasten en deze kunnen ook de morfologie van de chromosomen aantasten.

2, In het wortelmeristeem zitten de cellen in verschillende stadia van de mitose en zijn verschillend gevoelig voor de inwerking van chemische substanties. Dierlijke celkweken kunnen min of meer synchroon lopen door b.v. een behandeling met colcemid.

3, De resultaten zijn niet zonder meer toepasbaar op zoogdiercellen.

MATERIAAL EN METHODES.

A Kweekschema's Vicia faba.

1, Volgens schema 1976 (lab).

a) In de week zetten; in leidingwater, geregeld verversen, 2 tot 3 dagen. Goed gezwollen exemplaren worden gebruikt, de rest verder laten weken tot ze voldoende opgezwollen zijn.

b) Kiemen van de bonen; op een bak met watten tussen twee lagen filtreerpapier, bij ongeveer 23°C. in het donker tussen twee plastic bakken. Tijdsduur ± 3 dagen.
De mitosecyclus bij 22°C. = 20 uur, volgens Kihlman '75.
Na drie dagen kiemen hebben de wortels een lengte van 3 cm.

c) Voor een chemische behandeling van de primaire wortel; hoofdwortels met een lengte van ± 2 cm. worden met de wortel in de vloeistof op een erlemeyer gezet. Indien er veel bonen zijn, kunnen ze op parafinepapier op een bakje geplaatst worden met de wortel door het papier in de vloeistof.

d) Voor een chemische behandeling van de zijwortels; van de hoofdwortel met een lengte van ongeveer 2 cm. wordt de top afgesneden (± 2 - 3 mm.) De wortel wordt daarna in water gedaan, en dan na ongeveer 4 dagen zijn de zijwortels ± 2 cm.
Het tijdstip voor de chemische behandeling is niet zo belangrijk, zo gauw ze zichtbaar zijn, kunnen ze in de chemikaliën gezet worden. Een uitgegroeide zijwortel kan meer als 10 cm. lang zijn. Deze zijwortels bij voorkeur niet meer gebruiken.

Hoofd- en zijwortels kunnen op deze wijze zowel in het donker als in het licht gekweekt worden.

2, Bonen weken: (afwijkende procedure voor eerste proeven)

1	2
24 uur in een 10 % DMSO opl. met BrdU en FdU en uridine (zie blz.12) Daarna ± 40 uur verder weken in BrdU en FdU + uridine	60 uur in BrdU en FdU + uridine (zie blz. 12)

Bonen kiemen:

A	B
± 48 uur in BrdU en FdU + uridine → 1-2 cm Nr 36 geen kiemen!	48 uur in leidingwater → 1-2 cm Nr 36 geen kiemen!

Groei van de wortels:

1	2
In leidingwater	in BrdU en FdU + uridine

Na vier dagen konden de hoofdwortels geoogst worden code 1A, 2A.
Na de oogst van de hoofdworteltoppen zijn de wortels verder gekweekt om hiervan zijwortels te verkrijgen.
Bijvoorbeeld:

1 A 2 ; de zijwortels hebben 4 dagen in oplossing 2 gestaan en daarna zijn ze weer 2 dagen in leidingwater geïncubeerd.

2 A 2 ; idem als hierboven.

2 B 2 ; voor de groei van de wortels 2 dagen in oplossing 2 voor de groei van de wortels.

Bij deze wortels is er speciaal gelet op de groei van de zijwortels; alleen die wortels zijn geoogst, waarvan de groei goed te zien was, d.w.z. minstens 1 cm. per 24 uur . Op deze wijze is er goed materiaal verkregen.

3, a) Twee bonen zijn na de oogst van blz. 9 van de volgende soorten geplaatst in de oplossing no. 2 voor de groei van de wortels (blz. 9) na 7 dagen gegroeid te zijn in leidingwater.
Het zijn zijwortels van:
1 A 2
2 A 2

b) Twee bonen van het zelfde type als hierboven geplaatst in oplossing no. 2 waar aan is toegevoegd 0,005 % colchicine. Het betreft dus zijwortels van :
1 A 2
2 A 2

c) Idem als bij b, doch hier is de colchicine oplossing toegevoegd 0,0005 %. N.b. in deze colchicine oplossing zijn de stoffen BrdU enz. opgelost tot de juiste concentratie (zie blz.) .

4, a) Wortels van het volgende type zijn na de oogst niet gedurende 3 uur behandeld in een 0,1 % colchicine:

A 1	blz. 8
2 B 2	blz. 9
2 A	blz. 9
2 A 1	blz. 9

b) Wortels van het volgende type zijn na de oogst 16 uur geïncubeerd in een 0,1 % colchicine oplossing;
2 A 2 blz. 9

5, Koeling van hoofdwortels.

Onderzocht is het effect van koeling op de groei van hoofdwortels.
Getest zijn hoofdwortels met een lengte variërend van 2 tot 5 cm. Deze zijn drie dagen bewaard in een vochtige glazen kamer in de koelkast bij 2°C.
Als ze hier uit worden gehaald is er geen zichtbare groei op getreden. Geplaatst in verdere kweekomstandigheden gaan de bonen door met de groei zonder onderscheid met bonen die geen koude behandeling hebben gehad.

B Incubatie media.

1, Volgens Kihlman 1974..

a) Voor het kweken van TT en TB strengen DNA.

1 dag in: 100 uM BrdU fabrikaat:
Sigma grade.
0,1 uM fluordesoxyuridine FdU
fabr. Sigma grade.
5 uM uridine
fabr. Sigma grade.
De pH van dit mengsel is 5,8

1 dag in: 100 uM thymidine (Sigma)
5 uM uridine (Sigma) pH=5,7

Daarna de worteltoppen afsnijden.
Hoofdwortels 2-3 mm., zijwortels 1-2 mm.
In de colchicine oplossing 0,1 % gedurende 3 uur.
Fixeren in Carnoy 3:1 (ethanol : azijnzuur).
Opslaan in dit fixatiemengsel in de diepvries.
Bewaarduur onbeperkt.
Tijdsduur fixatie: minimaal 30 min. beter is een nacht over in de diepvries.

b) Voor het kweken van TB en BB strengen DNA.

2 dagen in: 100 uM BrdU
0,1 uM FdU pH = 5,8
5 uM uridine

enz. als bij a).

2, <u>De werking van de chemikaliën</u>. (Dutrillaux et al. 1976)

BrdU kan worden ingebouwd in plaats van thymidine in het DNA. Om dit te laten inbouwen moet de eigen thymine synthese geblokkeerd worden.
In de syntheseweg voor de vorming van thymine wordt de volgende stap geblokkeerd door FdU:

desoxyuridine monofosfaat
↓ ← FdU blokkeert
desoxythymidine monofosfaat
↓
enz. naar thymidine

Uridine wordt toegevoegd om een eventuele remming van de vorming door FdU, nodig voor de RNA synthese, onwerkzaam te maken.

De colchicine behandeling van de worteltoppen na de oogsting gedurende drie uur, dient om de chromosomen te blokkeren in het metafasestadium.

onder 1a BrdU, FdU en uridine kunnen in de koelkast bewaard worden als stockoplossingen. Alleen BrdU moet beschermd worden tegen lichtinvloeden.
Concentraties: (hoeveel moet in de [illegible] d
<u>BrdU</u> 6 mg./ml. 0,5 ml. toevoegen aan 100 cc. leiding- 5mg/100ml
water. 200x
500x
<u>FdU</u> 0,12 mg./ml. 0,02 ml. in 100 cc. leidingwater.
1000x
<u>uridine</u> 1,2 mg./ml. 0,1 ml. in 100 cc. leidingwater.
50x
<u>thymidine</u> 1,13 mg./ml. 2 ml. in 100 cc. leidingwater.

C KLEURINGEN EN BIJBEHORENDE VOOR - EN NABEHANDELINGEN.

1, Giemsa kleuring.

a) Volgens Korenberg en Freedlender 1974.
Zij pasten deze kleuring toe op Chinese hamster ovarium cellen en op menselijke perifere leukocyten.

1) Aan de lucht gedroogde preparaten die ten minste 1 dag oud waren, worden 10 min. geïncubeerd bij 88 - 89°C. in een 1 M $NaHPO_4$ buffer pH 8,0
2) Kort door water in een waterbad van 23°C.
3) Dan een giemsa kleuring in een 5 ml. giemsa oplossing in 100 ml. water gedurende 2 tot 10 min. Deze oplossing moet telkens weer opnieuw gemaakt worden.
4) Drogen aan de lucht, dan eventueel permanent maken met euparal.

b) Volgens Leiden. (Academische ziekenhuis) van weinig discriminerend

1) Preparaat 15 - 20 min. incuberen bij 85 - 90° in 0,06 M $NaHPO_4$ pH 8,0
2) Afkoelen.
3) Preïncuberen gedurende 5 min. in een citroenzuurfosfaat buffer of Gurrs buffer tabletten, 0,06 M pH=6,8
4) Kleuren gedurende 10 tot 15 min. in een 1 : 20 verdunning van giemsa in bovenstaande buffer.

"Mogelijk moet de incubatieduur of de temperatuur wat aan de omstandigheden worden aangepast."

c) Eigen variatie.

1) Als bij a), doch 2 is veranderd in: drogen aan de lucht.

d) Idem.

1) Als bij a), doch 3 is veranderd in: een giemsa oplos-

sing in: 1e een fosfaatbuffer M= 0,06 pH= 6,8
2e een citroenzuur fosfaat buffer als bij b). pre incubatie
3e water.

e) Volgens Leiden, maar punt 3 en 4 zijn veranderd wat de buffer betreft.

1) Tijdsduur in de hete fosfaatbuffer 5, 10 en 20 minuten
2) Het afkoelen is als volgt uitgevoerd:
   a, direkt preïncuberen in de fosfaat-buffer bij kamertemperatuur M=0,06 pH= 6,8
   b, even laten afkoelen in de lucht en dan in de fosfaat buffer.

f) Als bij b), doch de hittebehandeling is uitgevoerd in 0,5 x SSC. (zie g)
Verder is er gebruik gemaakt van een giemsa oplossing in een fosfaat buffer als bij e-2.

g) Volgens Wolff en Perry 1974.

1) Zij hebben de giemsa kleuring toegepast na de hoechst kleuring.
2) De preparaten waren 1 dag oud alvorens ze met giemsa te kleuren.
3) De hittebehandeling: tijdsduur 2 uur in een 2 x SSC oplossing bij 62,5 °C.
4) 2 x wil zeggen dat de oplossing 5 maal verdund is.
5) Normaal is een 10 x SSC oplossing die bestaat uit 0,075 M NaCL en 0,0075 M $Na_3C_6H_5O_7$.
6) SSC zou een duidelijker beeld van de chromosomen geven.

2, Tionine voorbehandeling bij de giemsa kleuring.

a) Volgens Goto et al. 1975

1) Droog preparaat kort in gedem. water.
2) 5 min. incuberen in een oplossing die 10^{-3} M. thionine bevat in gedem. water.
3) 5 min. incuberen in 0,16 M Na-fosfaat-citraat buffer pH 7,0
4) Afdekken in buffer met een dekglaasje en afranden met nagellak.
5) Plaatsing in direkt zonlicht gedurende drie uur.
6) Verwijder dekglas met een scheermesje, was met water en kleur het preparaat vervolgens met een Giemsa oplossing.

3, <u>Acridine oranje kleuring en voorbehandeling voor een giemsa kleuring</u>.

a) Volgens Leiden.

1) Stockoplossing : 1 mg. AO in 1 ml.citroenz.-fosfaat-buffer 0,06 M. pH= 6,8
2) Deze oplossing verdunnen met bovenstaande buffer als volgt: 1 ml. stockoplossing in 100 ml buffer.
Deze buffer moet in de koelkast bewaard worden, en is slechts beperkt houdbaar ± 1 week.
De kleuroplossing is enkele dagen houdbaar ± 2 dagen.
3) Kleuring.
5 min. preïncubatie van het preparaat in de buffer.
5 min. kleuren in de AO kleuroplossing.
5 min. in de buffer.
afdekken met een dekglaasje en afranden met nagellak.
4) De preparaten zijn te bewaren in de koelkast gedurende enkele dagen.

b) Volgens 1 Pearse , 2 Pearson and Egmond cowan. (selijk)

1) Zij kleuren 15 min. in bovenstaande kleuroplossing.
2) Bekijken met een fluorescentiemikroskoop.
Opvallend licht met een golflengte onder de 470 nm.
Doorvallend licht via het oculair boven de 490 nm.

c) Eigen methode.

1) Geen citroenzuur fosfaat buffer, maar alleen een fosfaat buffer met pH 6,8. Deze buffer is lang te bewaren bij kamertemperatuur.
2) Tijdsduur van de kleuring variërend van 5 min. tot 20 min. in stappen van 5 min.

d) Als c.

1) bekijken bij doorvallend licht met een golflengte boven de 590 nm.

e) Volgens Miller, Aronson en Nichols 1976.

1) Met hoechst gekleurde preparaten zijn bij kamertemperatuur weggezet gedurende 18 tot 24 uur.
2) Gedurende de laatste twee uur zijn ze bestraald met U.V. licht.
3) Daarna zijn de dekglazen verwijderd en zijn de preparaten behandeld met een hittebehandeling op de volgende wijze:
   a, TB/BB DNA 10 min. bij 60°C. in water.
   b, TT/TB DNA 10 min. bij 84°C. in water.
4) Kleuring in een 3 % Giemsa oplossing gedurende 3 tot 6 min.
5) De preparaten werden door gedem. water gehaald en gedroogd aan de lucht.

f) Eigen methode.

1) AO oplossing: 1 mg. in 100 ml. fosfaat buffer pH= 6,8 M= 0,06.
   Deze oplossing is ongeveer 5 dagen te gebruiken. (Na deze tijd vormen zich kleine groen fluorescerende bacteriën in de vloeistof, die dan ook in de preparaten komen)
2) Direkt wordt een preparaat in de oplossing 1) gedaan en blijft daar 5 min. in. Vervolgens 2 min. in de buffer (als bij 1) en daarna afdekken en afranden met nagellak.
3) Bekijken volgens b-2 op de vorige blz. 17

4, RNAse behandeling.

a) Volgens Kihlman 1975.

1) Droge preparaten worden 60 min. geïncubeerd bij 27°C in een vochtige kamer met een RNAse oplossing bevattende 1 mg. RNAse opgelost in 10 ml. 0,5 x SSC.
2) Op het preparaat wordt 200 uL RNAse oplossing gebracht en hierop wordt een dekglaasje geplaatst.

b) Eigen methode.

1) 1 mg. oplossen in 5 ml. 0,5 x SSC.
2) Verhitten van de RNAse oplossing tot 80°C. gedurende 10 min..
RNAse is een stabiel enzym dat in droge vorm onbeperkt bewaard kan worden in de diepvries. Bij verhitting gaat het laatst spoortje DNAse verloren (volgens J.Kooistra). De aktiviteit gaat door de hittebehandeling slechts weinig achteruit.

c) Idem als b) doch RNAse opgelost in water.

1) Droge preparaten werden in een stoof geplaatst bij 37°C. waar twee lagen watten, gedrengt in water, in komen te liggen om een verzadigde dampspanning te krijgen.
2) Op het preparaat worden drie druppels water met RNAse gedaan.
3) Tijdsduur in de stoof: 30 min. 1 uur, 2 uur, 4 uur, en 16 uur.
4) Daarna AO kleuring.

D MAKEN VAN PREPARATEN, MACERATIE.

1) Worteltoppen uit de fixatievloeistof halen.
2) Door water halen.
3) Macereren in HCL of pectinase.
4) Breng de wortel op een objectglas in een druppel water of 23% azijnzuur oplossing of in een druppel bestaande uit water en eiwit-glycerine 1:1.
5) Breng een dekglas aan en squash het preparaat stevig tussen filtreerpapier.
6) Breng het preparaat in de diepvries en wacht ten minste 15 min. Beter is het om twee uur te wachten.
7) Wip nog in de diepvries met een scheermesje het dekglas van het objectglas.
8) Laat het preparaat drogen in de lucht.

Maceratie.

a) In HCL. (Kuhlhorn 75)

1) Er is gemacereerd in 0,1 N.,1 N., en 5 N HCL.
2) In elke concentratie zijn de wortels bij 37°C. in de stoof gedurende 10 min. 20 min. en 30 min. geïncubeerd.
   Hoofdworteltoppen worden eerst in vieren gesneden om een betere inwerking te krijgen.
3) Daarna snel verwerken volgens bovenstaand schema van af punt 4 doch eerst door water halen om het achter gebleven zoutzuur te verwijderen.

Voor de giemsa kleuring is de maceratie in 0,1 N HCL gedurende 15 min. voldoende bij 37°C.

Het squashen met HCL kan het beste als volgt gebeuren. Hak met een scheermesje de worteltop in kleine stukjes verspreid de stukjes en vervolg van af punt 4 hierboven.

Maceratie

b) In pectinase volgens Kihlman '75.

1) Na fixatie spoelen van de wortels in een 0,01M. citroenzuur- Na-citraat buffer pH 4,7.
2) Incubatie gedurende 75 min. in een stoof bij $27^{o}C$. met een 0,5 % pectinase oplossing in de zelfde buffer.

c) In pectinase, eigen methode.

1) Na fixatie spoelen van de wortels in water.
2) Incubatie van de wortels (hoofdworteltoppen in vieren snijden) in de volgende pectinase oplossingen: 0,5 % en 2% in water.
3) Tijdsduur van de incubatie in pectinase: 1 uur , 2 uur , 4 uur , 16 uur . temperatuur: $37^{o}C$.
4) Squashen op een objectglas of in een druppel bestaande uit 50% water en 50% eiwit-glycerine, of in water op een objectglas waar een laagje eiwit-glycerine op aanwezig is.

d) Idem als bij c.

1) De pectinase is nu opgelost in een 0,01M. citroenzuur- Na-citraat buffer pH 4,7 ($C_6H_8O_7.H_2O$ en $Na_3C_6H_5O_7.2H_2O$)

Een goede maceratie met pectinase is volgens methode c), tijdsduur: in 2% oplossing 2 uur; in 0,5 % opl. 4 uur.
De pectinase oplossing is 4 dagen te bewaren in de koelkast.

Het squashen in pectinase kan het beste als volgt gebeuren:
Breng een druppel half water, half eiwitglycerine op een objectglas. Breng de worteltop er op aan en wrijf met een glasstaafje de wortel fijn op het objectglas en vervolg dan de squash procedure.

Cf [illegible] [illegible] [illegible] in [illegible] [illegible].

E VERDERE BEHANDELINGEN.

a) Nafixatie.

1) Er is gebruik gemaakt van ethanol: azijnzuur : formol = 85: 5 : 10 .
2) Het is toegepast op preparaten die na dat ze uit de diepvries kwamen, aan de lucht gedroogd waren.

b) Veroudering.

1) Preparaten uit de diepvries, die aan de lucht gedroogd zijn, zijn in de vensterbank weggezet, zodanig, dat er geen direkt zonlicht op kon vallen. Na 48 uur zijn ze weer gebruikt.

c) Behandeling van wortels met DMSO.

1) DMSO, (di-methyl-sulf-oxide) dient om de membranen in de wortelcellen doorlaatbaar te maken.
2) 16 kiemplanten met wortels met een lengte van 2 cm. zijn de volgende tijden in een 10 % DMSO oplossing geplaatst:
   10 min. , 20 min. , 1 uur , 8 uur .
3) 8 bonen zijn verder gekweekt op TT/TB strengen DNA en 8 bonen zijn gekweekt op TB/BB strengen DNA

4) Resultaten.

a) De wortels die 1 en 8 uur in de DMSO oplossing hebben gestaan zijn zwart en verschrompeld en ongeschikt om mikroskopisch te bekijken.

b) De wortels die 10 en 20 min. in DMSO geïncubeerd zijn, zijn niet meer gegroeid en zwart van kleur.

c) Haematoxyline kleuring (na het oogsten, fixatie enz.) toonde aan dat er nog wel chromosomen te zien waren, doch slechts zeer weinig. De kernen waren klein en verschrompeld.

d) Behandeling van bonen met DMSO tijdens het weken.

1) zie hiervoor blz. 9 , weken 1.

2) Resultaat. Geen invloed te merken, geen verschil met andere bonen.

e) Kleuring, behandeling enz. van hele worteltoppen.

1) Hele worteltoppen zijn: a, direkt gekleurd in een Giemsa oplossing, tijd = 30 min.

b, hitte behandeling volgens C, b op blz. daarna 30 min in een Giemsa opl.

Resultaat, geen goede inwerking van de kleurstof.

In totaal zijn hiervoor 6 worteltoppen gebruikt.

2) Hele worteltoppen zijn behandeld in een mengsel van een pectinase oplossing 0,5 % : een RNAse oplossing volgens blz. 19 c = 2 : 1.
Tijd: 4 uur en 16 uur.

Resultaat, geen goede werking van de RNAse oplossing (bekeken met de AO kleuring en de florescentie mikroskoop). De pectinase werkte wel goed.

3) Hele worteltoppen zijn behandeld achtereenvolgens in:
1e pectinase gedurende 4 uur
2e RNAse gedurende 2 uur
3e AO kleuroplossing 30 min.

Resultaat, het materiaal kan op deze wijze niet wegspoelen, doch noch de kleuring nog de RNAse werkte.

f) Het kweken van bonen op de volgende stoffen:

1) op 0,1 uM FdU + water
2) op 10 uM FdU + water
3) op 10 uM FdU + water + 100 uM BrdU +
5 uM uridine
4) op 10 uM FdU + water + 100 uM thymidine +
5 uM uridine

Resultaten:
1, Alle bonen groeiden goed.
2, De groei is gevolgd gedurende 10 dagen om cestrekking enz. niet voor groei aan te zien.
3, Bij een tweede experiment groeiden de bonen in oplossing 2 beter dan op oplossing 4.

In totaal zijn hiervoor 16 bonen gebruikt.

Conclusies:
1, Het effect van de remmer was niet te zien, daar oplossing 2 geen remming in de groei te zien gaf.
2, Het transport van de stoffen door het celmembraan verloopt vermoedelijk niet zoals door Kihlman verondersteld is.
3. In het vervolg is de concentratie van FdU gesteld op 1 uM.

Cytologisch onderzoek met een haematoxyline kleuring leverde normale resultaten op.

RESULTATEN EN DISCUSSIE.

A Giemsa kleuring. (TT/TB DNA voor 1 t/m 7)

1 Volgens Korenberg en Freedlender 1974 (C-1-a blz.14)

a) Er zijn 5 hoofdwortels en 5 zijworteltoppen gemacereerd in HCL en behandeld volgens Kihlman op blz. 12 , a). (TT/TB DNA)

Resultaten, chromosomen waren niet of slechts zelden te zien in de preparaten. Van een differentiele kleuring was geen sprake.

b) Kleuring van droge preparaten met haematoxyline lieten veel cellen zien die metafaseplaten bevatten. Hieruit kon de conclusie getrokken worden dat de preparaten veel te lijden hebben van de behandeling in de verschillende baden. (HIER MOG NIET DE [illegible] WERD MOG GEEN [illegible] GEBRUIKT.

WEL OP GLAASJE AANGEBRACHT

2 Volgens Leiden. (C-1-b blz. 14)

a) Hiervoor zijn de volgende wortels gekweekt:

1, hoofdwortels in het donker
2, hoofdwortels in het licht
3, zijwortels in het donker
4, zijwortels in het licht

Kweekmethode B-1-a blz. 12. TT/TB DNA
Maceratie: HCL en pectinase.
Er zijn 8 kombinaties en per kombinatie zijn er drie preparaten gemaakt.

Resultaten: 1, Geen differentiele kleuring.

2, De laag eiwitglycerine liet in vele preparaten los van het objectglas.

3, Van pectinase maceratie wordt bij een hitte behandeling afgezien.

4, In vergelijking met 1 van blz. 14 maakt het niets uit of er nu een hittebehandeling wordt uitgevoerd in een 1 M. of een 0,06 M fosfaat buffer.

5, De hittebehandeling is zeer slecht voor de preparaten, want uit beelden verkregen met een haematoxyline kleuring volgde dat er in de oorspronkelijke preparaten veel metafaseplaten zaten.

6, Er was geen verschil te konstateren tussen de beelden die van de vier soorten wortels waren verkregen.

7, Preparaten die 15 min in de hete buffer waren geweest moesten ook wat langer in de giemsa kleuroplossing staan. (ook ± 15 min.)

3 Volgens c van blz. 14

a) ook hier is gebruik gemaakt van preparaten van wortels die gekweekt zijn volgens B-1-a blz. 12 op TT/TB DNA.

b) Bij 6 preparaten is het effect na gegaan van droging aan de lucht na de hittebehandeling alvorens te worden geïncubeerd in de buffer.

Resultaat. Vergeleken met de beelden verkregen uit 1 en 2 was er geen verschil te konstateren.

4 Volgens d van blz. 14

a) Kweekmethode volgens blz. 12 B-1-a . TT/TB DNA.
b) Er is gekeken naar het effect van de verschillende soorten buffers en water als oplosmiddel voor de giemsa kleurstof.

Resultaat. 1, Er was geen verschil te konstateren tussen het effect van de beide buffers, wel waren de kernen van de wateroplossing wat meer gezwollen.
2, Gekozen is voor een fosfaat buffer i.v.m. een betere houdbaarheid, en ook om 1.
3, Geen differentiele kleuring.

In totaal zijn er 9 preparaten gebruikt.

5 Volgens e van blz. 15 .

a) 18 preparaten zijn er gemaakt van TT/TB wortels.

Resultaat. 1, De wortelpreparaten die 5 min. in de hete buffer zijn geweest zagen er het beste uit. Hier waren nog de meeste chromosomen te vinden d.w.z. ongeveer een tien per preparaat wat heel weinig is vergeleken met een preparaat wat met haematoxyline is gekleurd.
2, De preparaten die 10 min geïncubeerd zijn bevatten gemiddeld misschien drie chromosomen.
3, De 20 min. preparaten bevatten geen chromosomen. Ze moesten zeker 20 min. in de giemsa liggen om voldoende gekleurd te worden.

4, T.a.v. punt 2 van e was er geen verschil te vinden.
5, Geen differentiele kleuring.

6 Volgens f van blz. 15

a) Er is gebruik gemaakt van een giemsa oplossing in een fosfaatbuffer als bij e-2 van blz. 15
b) 3 preparaten zijn gebruikt van wortels die TT/TB DNA hadden.

Resultaat. 1 Geen differentiele kleuring.
2 Vergeleken met de resultaten tot nu toe is er geen verschil te konstateren.

7 Volgens g van blz. 15.

a) Deze methode is gevolgd vanaf punt 2 , dus zonder de fluorescentiekleuring vooraf. In een later stadium is deze methode wel in zijn geheel gevolgd.
b) Hiervoor zijn 4 preparaten gebruikt van zijwortels met TT/TB DNA. (Kweekmethode B-1-a, blz. 12)

Resultaat. 1, Geen differentiele kleuring.
2, Geen chromosomen waren te zien.
3, De cellen waren nog wel te zien, de kernen vertoonden een verschrompeld beeld.

B Giemsa kleuring. (TB/BB DNA voor 1 t/m 7)

1) Volgens Korenberg en Freedlender 1974.

a) Er zijn 4 zijwortels gebruikt.
b) Kweekmethode volgens blz. 12 B-1-b.
Resultaat. Geen afwijking met die van blz. 26

2) Volgens Leiden.

a) Voor deze proef zijn er per kombinatie 2 preparaten gemaakt.
Resultaat. Geen afwijking met die van blz. 27

3) Volgens c van blz. 14
a) Niet gedaan.

4) Volgens d van blz. 14 en 15.

a) Niet gedaan.

5) Volgens e van blz. 15

a) 9 preparaten zijn er gemaakt.
b) Alleen punt 2 a van e is toegepast.
Resultaat. Geen afwijking met die van blz.28 en 29 .

6) Volgens f van blz. 15 .

a) 2 preparaten zijn gebruikt.
Resultaat. Geen afwijking met die van blz. 29

7) Volgens g van blz. 15 .

a) Niet gedaan.

C Thionine voorbehandeling bij de giemsa kleuring.

1 Volgens Goto et al. blz. 16 .

a) Kweekmethoden volgens blz. 9, 10 en 12.
b) Zowel TT/TB als TB/BB strengen DNA.
c) Zowel hoofd- als zijworteltoppen zijn gebruikt.
d) Maceratie met HCL en pectinase.
e) Het totale aantal preparaten die gebruikt zijn bedraagt rond de honderd.
f) De proef is uitgevoerd over vele experimenten met een tijdsduur van ruim een maand.
g) De volgende preparaten zijn gebruikt:

1, die 24 uur in de open lucht hadden gestaan.
2, die 48 uur in de open lucht hadden gestaan.
3, die enkele dagen (2 of 3) in de koelkast hadden gestaan.
4, die droog waren weggezet in de diepvries en na 4 dagen er weer uit waren gehaald.

Resultaat. 1, Vele goed gekleurde preparaten zijn op deze wijze verkregen.
2, Geen differentiele kleuring tussen de zusterchromatiden.
3, Vergeleken met de haematoxyline kleuring was er in deze preparaten slechts weinig materiaal verloren gegaan.
4, De verschillende preparaten uit g) waren niet verschillend wat hun beelden betrof onder de mikroskoop.

D Acridine oranje kleuring als voorbereiding op een giemsa kleuring.

Volgens f op blz. 18 .

a) De wortels zijn gekweekt volgens blz. 9, 10 en 12.
b) Zowel hoofd als zijworteltoppen zijn gebruikt.
c) Ongeveer 40 preparaten, die volgens methode f op blz. 18 gemaakt zijn en waarvan het mikrokopische beeld redelijk veel chromosomen liet zien, zijn gebruikt.
d) Deze preparaten hebben ook een RNAse behandeling ondergaan volgens blz. 19 punt b en c.
e) Vervolgens hebben de preparaten een giemsa kleuring ondergaan volgens blz.14 1-a punt 3 en 4. Buffer blz. 15-e-2.

Resultaat. 1, De cellen hebben een groen-blauwe kleur gekregen.
2, Veel chromosomen zijn verdwenen.
3, Geen differentiele kleuring.

Later is met 6 preparaten, als bij hierboven, dezelfde proef uitgevoerd maar dan met de methode volgens Miller et al. blz.18 - e . In plaats van U.V. licht is zonlicht gebruikt.

Resultaat. 1, Alle preparaten waren hun chromosomen verloren.
2, De kernen zagen er verschrompeld uit.

E Discussie over de giemsa kleuring.

1. De giemsa kleuring volgens Korenberg en Freedlender van blz. 14 voldeed niet. Daarom is er gekeken naar de methode volgens Leiden op blz. 14.
2. Ook deze kleuring leidde niet naar het gewenste resultaat. Opnieuw werd duidelijk dat de hittebehandeling slecht was voor het materiaal op de objectglazen.
3. Daar veel materiaal losliet van het objectglas is geprobeerd of een tussentijdse opdroging ook een verbetering zou zijn. (blz. 14 punt c) Opnieuw geen resultaat.
4. Ook was het van geen invloed of de hittebehandeling in een 1 M. of een 0,06 M. buffer plaatsvond, of in een SSC oplossing.
5. De tijdsduur doorgebracht in de hete buffer had wel effect op de kwaliteit van de preparaten, doch niet op de differentiele kleurbaarheid van de chromatiden.
6. Veroudering van de preparaten, waardoor fotolysis zou optreden, waarna de differentiele kleuring zichtbaar gemaakt zou kunnen worden, had geen effect.
7. Geprobeerd is ook om nafixatie toe te passen om te kijken of dit effect zou kunnen hebben op de differentiele kleuring; doch ook dit leide niet tot resultaten.
8. Ook de methode van Wolff en Perry (blz. 15-g) heeft niet tot de resultaten geleid die door hen gevonden zijn.
9. Alle mogelijke wortelkombinaties voor wat betreft groei, soort, en incubatieperioden zijn uitgeprobeerd doch zonder resultaat.
10. De preparaten die gemaakt waren volgens Goto et al. blz. 16 , leverden de mooiste beelden op, maar geen differentiele kleuring.
11. Daarom is er gekeken naar de mogelijkheden die te bereiken zijn met de acridine oranje kleuring, daar deze kleuring eenvoudig is, direkt werkt en volgens de onderzoekers goed voldoet.

F De acridine oranje kleuring.

Doordat de giemsa techniek niet tot de verwachte resultaten heeft geleid is er gebruik gemaakt van de acridine oranje kleuring.

1 Volgens Leiden, blz. 17 .

a) Uitgegaan is er van 20 preparaten met TT/TB en 20 met TB/BB DNA strengen.
b) De preparaten zijn gemacereerd in HCL en in pectinase.

Resultaten. 1, Preparaten gemacereerd in pectinase vertoonden betere beelden dan die in HCL waren gemacereerd.
2, Ook het plasma was sterk rood gekleurd.
3, Slechts enkele chromosomen waren te zien.
4, Geen differentiele fluorescentie.

Conclusies: 1, In het vervolg macereren in pectinase.
2, Een RNAse behandeling toe gaan passen.
3, Kijken naar de verschillende golflengtes van het licht. Vergelijken van b en d van blz. 17 respectiveelijk 18 .

2 Volgens c op blz. 17 en b en c op blz. 19 .

a) Hiervoor zijn ongeveer 100 preparaten gebruikt. Zie hiervoor blz. 32 D -a -b .

Resultaten. 1, Geen differentiele fluorescentie.
2, De fosfaat buffer voldoet net zo goed.
3, 5 min. is de beste tijdsduur voor de

kleuring.

4, De golflengtes van b op blz.17 zijn beter dan die van d op blz. 18 . DNA wordt dan groen van kleur en RNA rood.

5, Het maakte geen verschil of de RNAse was opgelost in water of SSC.

6, Het optimum voor de werking van de RNAse lag tussen de 1 en de 2 uur. Dit steekt niet zo nauw.

3 Volgens Kihlman blz. 19 - a.

a) Ten aanzien van punt 2 kan gezegd worden dat hierdoor het materiaal meer te lijden had dan van de behandeling voorgesteld door punt 2 van c - blz. 19 .

4 Volgens f van blz. 18 .

a) Het gaat hier om de wortels met de code: 1A, 2A, van blz. 9 .

b) Daar de celdeling begint als de bonen in de kiembak komen. Zuurstof kan dan in kontakt komen met de cellen en het groeiproces begint.
Na 48 uur behoort er in de worteltoppen TB/BB DNA aanwezig te zijn.

c) Hiervan zijn twee series van 4 bonen gekweekt, en deze zijn vergeleken met een serie van drie bonen die zowel geweekt als ontkiemd zijn in water.

Resultaten. 1, De preparaten bevatten geen metafaseplaten (hoofdworteltoppen van 1A en 2 A).

2, De preparaten van de hoofdworteltoppen die zowel geweekt als ontkiemd zijn in water vertoonden een normaal beeld met vrij veel metafaseplaten en losse chromosomen. Toch varieerde het aantal metafaseplaten en chromosomen bij deze laatste preparaten sterk, bv. in één preparaat zaten 14 metafaseplaten en wel 40 losse chromosomen en in een ander preparaat enkel wat losse chromosomen.

3, De kiemwortels van alle preparaten na de 48 uur kieming hadden een lengte van ongeveer 1 cm.

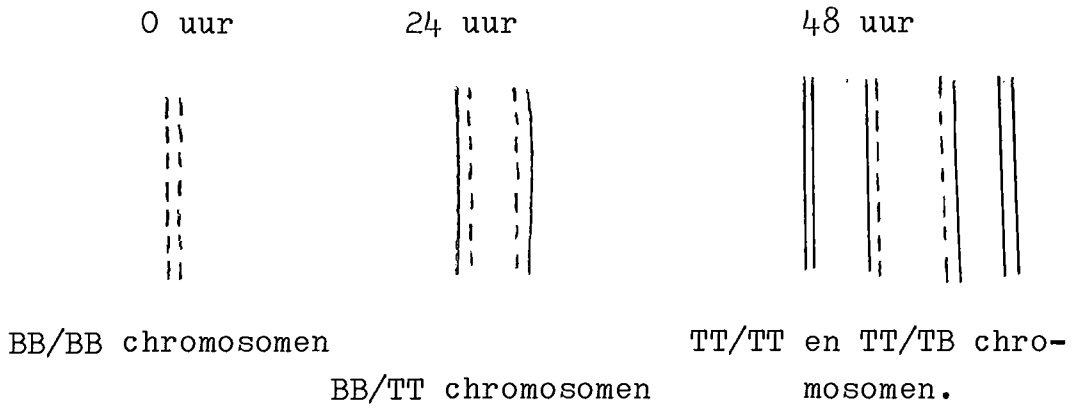
5 Volgens f van blz. 18 .

a) Het gaat hier om de wortels met de code:

1 A 2	12 zijworteltoppen
2 A 2	9 zijworteltoppen
2 B 2	17 zijworteltoppen

b) Van elke worteltop is een preparaat gemaakt.

c) Volgens onderstaande schema wordt het duidelijk gemaakt wat het type DNA is van de wortels die de laatste twee dagen in leidingwater zijn gegroeid.



Resultaten. 1, Hierin zaten vrij veel metafaseplaten en losse chromosomen. Voorzichtig gezegd zo'n 10 redelijk platen gemiddeld per preparaat. Goede preparaten zijn bewaard en gebruikt bij de proeven op blz. 32

2, Geen differentiele fluorescentie.

3, De variatie van de preparaten was vrij sterk. Ook hier weer geen konstant beeld onder de mikreoskoop, het ene preparaat is goed en het volgende slecht,

6 Volgens f van blz. 18 .

a) Het gaat hier om de wortels van blz. 10 te weten die van 3 a,b en c.
b) Het gaat er om, om te kijken of de chromosomen wel twee maal gerepliceerd zijn.
c) Later bleek dat Taylor voor deze proef een colchicine concentratie van 0,05 % had gebruikt.

Resultaten. 1, 3 a, hieruit zijn 12 wortels gehaald, die verwerkt zijn tot preparaten. De beelden vertoonden de zelfde resultaten als de vorige bladzijden 36 en 37. (4 en 5)

2, 3b, hieruit zijn 14 zijwortels gehaald die verwerkt zijn tot preparaten. In 1 preparaat was een zeer fraai beeld te zien dat 12 chromosomen bevatte. Dit beeld stemde volledig met de waarnemingen van Kihlman overeen. ('75)

3, In de 48 uur die ze in de colchicine hebben doorgebracht zouden de chromosomen 48 per cel hebben moeten bedragen. Taylor vond dit wel bij Vicia faba. Hier zijn geen platen met meerdere chromosomen gevonden.

4, Ook t.a.v. 3 c kan het zelfde gezegd worden. Er zijn 12 preparaten gemaakt, die beelden vertoonden die over de gehele linie wat slechter waren dan bij 3 a en b.

7 Volgens f van blz. 18 .

a) Wortels van 4 - a van blz. 10 zijn bekeken.
b) Het doel van dit experiment was om na te gaan wat de colchicine doet met de chromosomen en of het nog van invloed is op de differentiele fluorescentie.

Resultaat. 1, Er waren wat minder metafaseplaten en wat meer anafaseplaten in vergelijking met de wortels die wel drie uur in de colchicine waren geïncubeerd.
2, Geen differentiele fluorescentie.

8 Volgens f van blz. 18.

a) Hiervoor zijn preparaten gemaakt van de wortels van proef 4-b, van blz. 10.
b) Het doel was, om na te gaan, wat het effect van colchicine is op langere termijn op worteltoppen alvorens ze gefixeerd worden.
c) Tien zijwortels zijn tot preparaten verwerkt.
Resultaat. 1, Alle cellen waren in de interfase.
2, Geen chromosomen waren te zien.
3, De interfasekernen waren niet groter dan normale interfasekernen.
Conclusie. 1, Drie uur in de colchicine is een goede tijd.

?

G Discussie over de acridine oranje kleuring.

1. Ook deze methode heeft niet geleid tot het vinden van differentiel fluorescerende zusterchromatiden.
2. De mikroskopische beelden volgens blz. 17 - b en een RNAse behandeling volgens blz. 19 c , gedurende ± 1 uur lieten mooie metafaseplaten zien met gespreid liggende chromosomen.
3. Verschillende buffers voor de kleuring zijn geprobeerd en hieruit bleek dat het niet uitmaakte welke gebruikt werd.
4. De RNAse behandeling was voor de preparaten een noodzaak, om mooie beelden te verkrijgen zonder dat het plasma te rood van kleur werd. In de praktijk voldeed de volgende oplossing het beste om zo min mogelijk materiaal verloren te laten gaan. Aan het eind van de incubatie met RNAse moet de RNAse oplossing juist opgedroogd zijn. Is dit niet het geval dan spoelt er vrij veel van het materiaal weg als het preparaat in de buffer gaat.
5. Vreemd is dat de wortels met de code 1 A en 2 A geen metafaseplaten vertoonden wat in tegenstelling is tot de verwachting, hiervoor zijn geen redenen aan te voeren. Vergelijkbare "water" wortels vertoonden wel "normale" aantallen metafaseplaten.
6. Ook de omgekeerde methode volgens blz. 37 heeft niet tot de verwachtte resultaten geleid.
7. De behandeling met DMSO heeft niet datgene opgeleverd wat er van verwacht werd n.l. hindernis opruiming voor de inbouw van de chemikaliën. (= permeabel maken van de celmembranen)

H ALGEMENE CONCLUSIES EN OPMERKINGEN.

A De verschillende kleurmethodes hebben niet tot de gewenste resultaten geleid. Mogelijk speelt de ondoorlaatbaarheid van de celmembranen hierbij een belangrijke rol. Hiervoor zijn de volgende redenen aanwezig:

1. De kiemplanten groeiden uitstekend op een oplossing met een concentratie van 10 uM. FdU.
   Theoretisch kan dit niet, daar de synthese van de thymidine dan stil ligt en dit doet de groei stoppen.
2. De groei op het mengsel van BrdU enz. met 0,005% colchicine liet geen toename zien in het chromosoomaantal.
3. Andere onderzoekers gebruiken chinese hamstercellen of menselijke perifere leukocyten of beenmergcellen van ratten enz. Dit ondanks het feit dat dierlijke celkweken in principe moeilijker zijn.

Mogelijk zijn de gebruikte chemikaliën niet in de cel op genomen. Een suggestie voor verder onderzoek zou kunnen zijn dat er geëxperimenteerd wordt met de verschillende soorten tuinbonen.

B De concentratie van het BrdU is door mij niet gevarieerd daar de concentratie hier toegepast al erg hoog is in vergelijking met die gebruikt door andere onderzoekers.
Hier 30 ug. / ml. Bij Goto 2 ug./ml. Bij Kihlman 30 ug./ml.

C Het gebruik van een spuitbus (Lab. freeze van ICN Cleveland Ohio) is handig indien er snel even een preparaat bevroren moet worden, doch de vrijkomende gassen veroorzaken hoofdpijn.
Voor grotere series is de diepvries veel economischer in gebruik.

E Het onderdompelen van dekglaasjes in een Siliclad oplossing brengt een verbetering met zich mee voor wat betreft het verlies aan materiaal bij het afwippen van de dekglaasjes als het materiaal uit de diepvries komt.

Literatuur.

1. Carrano and Wolff. Distribution of sister chromatid exchanges in the euchromatin and heterochromatin of the indian muntjac. Chromosoma 53 361-369 '75.
2. Dutrillaux et al. Analyse des échanges de chromatides dans les cellules somatiques humaines. Cromosoma 48, 327-340 '74.
3. Dutrillaux et al. Differenciation des mecanismes induisant la segmentation et l'asymétrie des chromatids apres traitement par le 5- bromodeoxyuridine . Experimental cell research 97 313-321 '76.
4. Gibson P, Prescott D . Exp. Cell. Res., 74 397-402 '72.
5. Gurr. The rational use of dyes in biology. Leonard Hill , Londen '65 .
6. Ikushima T, Wolff S. Sister chromatid exchanges induced by licht flashes to 5- bromodeoxyuridine- and 5 iododeoxyuridine substituted Chinese hamster chromosomes. Exp. Cell res. 87 15- 19 '74.
7. Goto K et al. Simple differential Giemsa staining of sister chromatids after treatment with photosensitive Dyes and exposure to licht and the mechanism of staining. Chromosoma 53 223- 230 '75.
8. Kato H. Exp. Cell Res. 85 239-247 '74.
9. Kato H. Spontaneous sister chromatid exchanges detected by a BUdR-labelling method. Nature vol. 251 september 6 '74.
10. Kihlman B.A. Root tips of Vicia faba for the study of the induction of chromosomal aberations. Mutation Research 31 401-412 '75.
11. Kihlman and Kronborg. Sister chromatid exchanges in Vicia faba. Chromosoma 51 1-10 '75.
12. Kihlman. Effects of thiotepa etc. Chromosoma 51 1-10 '75.
13. Korenberg R. and Freedlender E. Giemsa technique for detection of sister chromatid exchanges. Chromosoma 48 355-360 '74.

14. Marin G. Prescott D.M.
J. Cell Biol. 21 159-167 '64.
15. Miller Aronson and Nichols.
Chromosoma 55 1-11 '76.
16. Nichols W. Hereditas 81 : 2 '75
17. Pearse E. Histochemistry theoretical and applied vol. 2.
18. Perry P. Wolff S. Nature London 251 156-158 '74.
19. Pearson and Egmond Cowan. Further developments in banding techniques for mammalian chromosomal identification.
20. Regan J. Setlow R. Ley R. Normal and defective repair of damaged DNA in human cells; a sensitive assay utilizing the photolysis of bromodeoxyuridine.
Proc. nat. Acad Sci. (Wash.) 68 708-712 '71.
21. Romeis. Mikroskopische technik.. Oldenburg verlag München-Wien '68.
22. Taylor J.H. Woods and Hughes 1956. The organization and duplication of chromosomes as revealed by autoradiographic studies using tritium-labeled thymidine.
PNAS 43 122-128 1956.
23. Wolff S. perry P. Differential giemsa staining of sister chromatids and the study of sister chromatid exchanges without autoradiography. Chromosoma 48 341-353 '74.
24. Wolff S. Mutation Res. 1 337-343 '64.
25. Zakharov A.F. Egolina N.A. Differential spiralization along mammalian mitotic chromosomes . I. Dudr-reversed differentiation in chinese hamster chromosomes.
Chromosoma 38 341-365 '72.