



AUTOR

Dr. Tanja Butt



Produktmanagement

Retsch[®]
MILLING SIEVING ASSISTING

Retsch GmbH
Retsch-Allee 1-5
42781 Haan, Germany

Telefon: +49 (0)2104/2333-178
E-Mail: t.butt@retschi.de

www.retschi.de

Wichtige Aspekte der Probenvorbereitung von biologischen Materialien

Vom Zellaufschluss bis zur Homogenisierung und Pulverisierung einer Vielzahl biologischer Probenmaterialien

Biologische Proben kommen in allen Formen und Konsistenzen vor: harte Knochen, zähe, faserige Pflanzen, zähes und viskoses Sputum, weiches Muskel-, Tumor- oder Lebergewebe. Ganz zu schweigen von den Millionen Zellen, wie z.B. Hefe, Bakterien oder Algen, welche aufgeschlossen werden, um die DNA oder RNA zu isolieren oder Proteine zu extrahieren. Für Forschungen in der Genomik, Transkriptomik oder Metabolomik werden alle Arten von biologischen Proben aufbereitet, die Probenvorbereitung ist der erste Schritt in jedem analytischen Prozess. RETSCH bietet ein breites Programm an Brechern und Mühlen für die reproduzierbare Pulverisierung von Feststoffproben; einige Modelle sind für den Zellaufschluss und die Homogenisierung biologischer Proben bestens geeignet.

In diesem Artikel wird der Einsatz von RETSCH Mühlen für die folgenden Anwendungen beschrieben:

- **Zellaufschluss von Hefe, Mikroalgen und Bakterien (in Suspension)**
- **Homogenisierung weicher und zäher biologischer Proben wie Sputum oder Leber**
- **Kryogene Vermahlung von Zellpellets, Muskelgewebe und Kiefernadeln**
- **Pulverisierung forensischer Proben: Knochen, Zähne und Haare**
- **Abwaschen von Bakterien von infiziertem Humangewebe zur weiteren Untersuchung**

Zellaufschluss von Hefe, Mikroalgen und Bakterien (in Suspension)

Der Zellaufschluss von Bakterien, Hefe, Fadenpilzen oder Mikroalgen ist ein Standardverfahren sowohl in der biologischen Grundlagenforschung als auch in der angewandten Biotechnologie und der medizinischen Forschung, um an Nukleinsäuren (DNA, RNA), Zellproteine oder Metabolite zu gelangen. Verschiedene Methoden eignen sich für den Zellaufschluss im Labormaßstab. Sie nutzen entweder Chemikalien oder mechanische Kräfte, um die Zellmembran und -struktur zu zerstören. Die mechanischen Verfahren ermöglichen die Zerstörung selbst dicker Zellwände, z. B. von Bacillus Sporen oder Mycobacterium Zellen, welche sich nur schwer lysieren lassen. Eine Zugabe von Chemikalien, welche die nachfolgende Extraktion beeinträchtigen könnte, ist nicht notwendig.

Bead Beating ist eine weit verbreitete und sehr effektive mechanische Methode für den Zellaufschluss, bei der Kügelchen aus Glas, Keramik oder Stahl eingesetzt werden. Diese werden gründlich mit der Zellsuspension durch Rühren oder Schütteln vermischt; Scherkräfte, die durch die große Oberfläche der Glaskügelchen entstehen, brechen die Zellwände auf und die Zellkomponenten treten aus. Bead Beating wird häufig für den Zellaufschluss in 2 ml Einweg-Reaktionsgefäßen genutzt, lässt sich aber auch in größerem Maßstab, z. B. in 50 ml Falcon® Tubes durchführen. Vorteile gegenüber anderen mechanischen Methoden wie z. B. der Sonifikation sind die einfache Durchführung, die Möglichkeit, mehrere Proben in einem Schritt zu bearbeiten, ohne das Risiko der Kreuzkontamination und der bessere Ertrag an Zellkomponenten. Das einfachste Bead Beating Verfahren besteht in der Mischung von Zellsuspension mit gleichem Volumenanteil Kügelchen und dem Einsatz eines Vortex Mixers. Diese Methode ist allerdings zeitaufwändig und fehleranfällig, besonders bei hohem Probendurchsatz oder bei Aufschlusszeiten von bis zu 10 Minuten. **Die RETSCH Schwingmühle MM 400 kann mit unterschiedlichen Adaptern betrieben werden, was den Zellaufschluss schnell, effizient und reproduzierbar macht.** Die Zellen werden automatisch aufgebrochen und der Laborant gewinnt Zeit für andere Aufgaben.

Für die Isolierung von DNA oder RNA wird üblicherweise weniger als 1 ml Zellmaterial benötigt, daher wird der Zellaufschluss häufig in 1,5 ml oder 2 ml Reaktionsgefäßen durchgeführt. RETSCH bietet verschiedene Adapter für diese Gefäße an, so dass bis zu 20 Proben in einem Arbeitsgang homogenisiert werden können. Für die Extraktion von Proteinen oder Metaboliten werden jedoch größere Mengen an Zellsuspension benötigt; hierfür sind **50 ml Zentrifugenröhrchen (Falcon® Tubes)** geeignet. In der MM 400 lassen sich 8 Proben à 30 ml Zellsuspension mithilfe eines Adapters simultan aufbereiten. Die fehlende Größe zwischen 2 ml und 50 ml ist jetzt mit den **neuen 5 ml Eppendorf Tubes erhältlich, welche ebenfalls in der MM 400 verwendet werden können.**

Fallbeispiel: Zellaufschluss von *Saccharomyces cerevisiae*

Um zum Beispiel die Funktionalität von Zellproteinen zu studieren ist es notwendig, ca. 30 ml Zellsuspension aufzuschließen. In einem Versuch wurde das automatisierte Verfahren mit der Schwingmühle MM 400 in Kombination mit dem Adapter für 8 konische Zentrifugenröhrchen mit der manuellen Methode unter Einsatz eines Vortexers verglichen. Beim Vortexen von 4 g Hefezellen mit 12 g Pufferlösung und 16 g Glaskügelchen (0,5 mm – 0,75 mm) in 50 ml Falcon® Tubes wurden 12 x 1 Minute benötigt, mit 1 Minute Zwischenkühlung auf Eis, um ausreichend Proteine zu erhalten. Der simultane Aufschluss von mehr als 2 Proben war nur möglich, indem mehrere Perso-

nen mehrere Vortexer in einer Reihe bearbeiten. Zudem war es erforderlich, die Proben unter den Anwendern auszutauschen, um anwenderspezifische und hardwarespezifische Unterschiede auszugleichen. Der Einsatz der Schwingmühle MM 400 vereinfacht die Laborarbeit deutlich. Mit dieser Mühle werden mehrere Zellsuspensionen automatisch bei 30 Hz aufgeschlossen. Im Vergleich konnte die benötigte Zeit auf 7 Minuten reduziert werden, mit deutlich besseren Proteinerträgen als beim Vortexen (Abb. 1). Ein weiterer Vorteil der automatisierten Methode ist der geringe Temperaturanstieg in der Zellsuspension während des Aufschlusses sowie die bessere Reproduzierbarkeit (Abb. 2 und 3).

Abb. 1: Gesamtproteinkonzentration nach Zellaufschluss mit der Schwingmühle MM 400 bzw. einem Vortexer, wird der benötigte Proteinertrag nach 7 min (MM 400) bzw. nach 12 min (Vortexer) erreicht

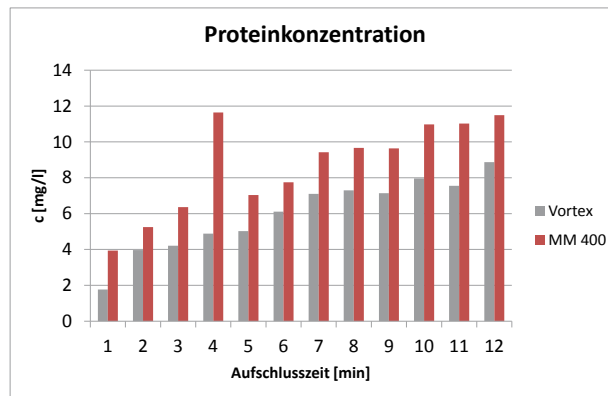


Abb. 2: Temperaturanstieg während Zellaufschluss in der MM 400 (bei 30 Hz) und mit Vortexer, Kühlung auf Eis nach jeder Minute Zellaufschluss

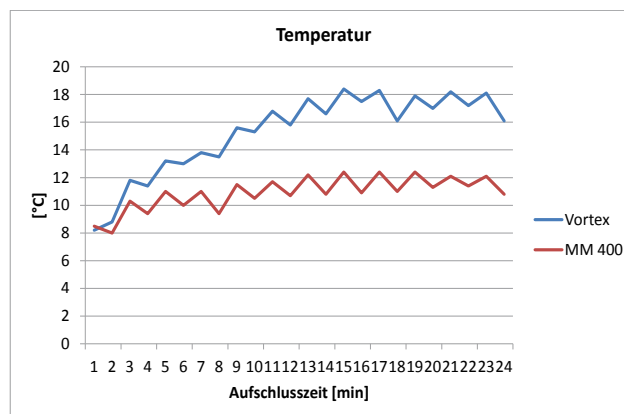


Abb. 3 (links): Bessere Reproduzierbarkeit der Gesamtproteinkonzentration nach Zellaufschluss, 7 min in der MM 400; 12 min Vortex; Fehlerbalken: % Standardabweichung

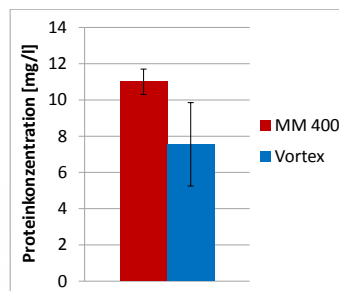
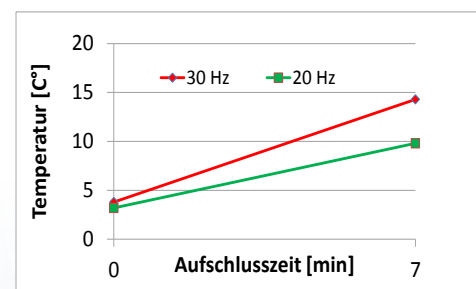
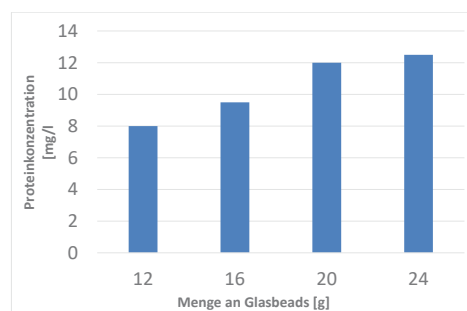
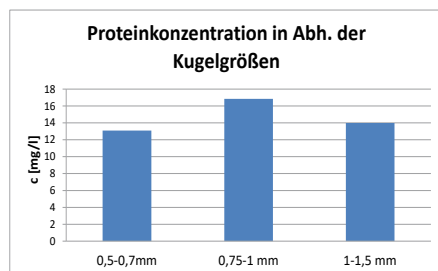


Abb. 4 (rechts): Temperaturanstieg, 7 min in der MM 400 bei 20 Hz oder 30 Hz, keine Zwischenkühlung auf Eis



Der Hefezellenaufschluss wurde durch das Variieren der Frequenz und der Kugelgröße optimiert. Für die Extraktion der Proteine war es vorteilhaft, die Frequenz auf 20 Hz zu reduzieren, was die Schaumbildung reduzierte und einen leichten Anstieg des Gesamtproteingehalts bewirkte. Zudem war der Temperaturanstieg bei 20 Hz geringer als bei 30 Hz (Abb. 4).

Abb. 5: Optimierung des Zellaufschlusses in der MM 400 durch Nutzung von Kugelgrößen zwischen 0,75 und 1 mm führt zu höchster Proteinkonzentration (links); die Proteinkonzentration wird von der Anzahl der Kügelchen beeinflusst (rechts).



In einem weiteren Versuch wurde der **Hefezellenaufschluss in der MM 400 mit dem Verfahren der Sonifikation verglichen**. Ein weiterer Vergleich bezog sich auf die Proteinkonzentration nach Zellaufschluss in 2 ml Reaktionsgefäßen und in 50 ml Zentrifugenröhrchen. Nach 5 Minuten war der Proteinertrag durch Bead Beating ca. 6 Mal höher als der Ertrag durch Sonifikation (Ergebnisse nicht dargestellt). Der Unterschied zwischen 1 ml Zellsuspension (2 ml Reaktionsgefäß) und 25 ml Zellsuspension (Zentrifugenröhrchen) war minimal.

Die Vorteile der automatisierten Zellaufschluss-Methode gegenüber dem manuellen Vortexen liegen auf der Hand. **Die Methode liefert einen hohen Proteinertrag, bietet exzellente Reproduzierbarkeit, erlaubt simultane Verarbeitung mehrerer Proben** und hält den Temperaturanstieg der Zellsuspension während des Aufschlusses in tolerierbaren Grenzen.

Fallbeispiel: Zellaufschluss von Mikroalgen

Der Zellaufschluss von Mikroalgen kann eine Herausforderung darstellen, da die Zellen den Schereffekten der Glaskugeln eher widerstehen. So war z.B. der Aufschluss von Kieselalgen mit einem Schüttler und Glaskugeln in der Vergangenheit nicht erfolgreich und die Zellen wurden mithilfe einer French Press aufgeschlossen. Mit der MM 400 in Kombination mit dem **Adapter für konische Zentrifugenröhrchen** hingegen lassen sich Zellen von Mikroalgen erfolgreich aufschließen. 300 ml Zellsuspension des Organismus *Thalassiosira pseudonana* wurden zentrifugiert, in 20 ml Pufferlösung suspendiert und in ein 50 ml Falcon® Tube gefüllt. 40 ml Glaskügelchen (90 µm bis 150 µm und 300 µm bis 400 µm, Verhältnis 1:1) wurden hinzugefügt und der Zellaufschluss wurde für 20 Sek. bei 20 Hz durchgeführt. Durch das Mikroskop ließ sich der vollständige Zellaufschluss erkennen (Abb. 6).

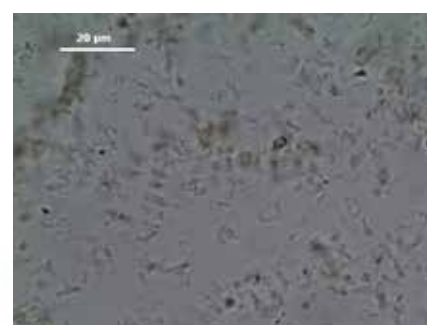
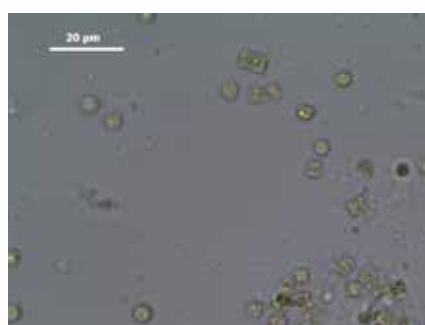


Abb. 6: Zellen der Kieselalge *Thalassiosira pseudonana* vor (links) und nach dem Aufschluss (rechts) mit der Schwingmühle MM 400 in Kombination mit dem Adapter für konische Zentrifugenröhrchen, 20 Sek bei 20 Hz.

Mit der MM 400 lässt sich auch die Alge *Phaeodactylum tricornutum* vollständig aufschließen, die Scherkräften leicht widersteht, da sie keine Silikatzellwand besitzt. 200 ml Zellkultur wurden zentrifugiert und wieder in 20 ml Aufschlusspuffer suspendiert und anschließend in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen gegeben. 40 ml Glasperlen (90 µm bis 150 µm und 300 µm bis 400 µm, Verhältnis 1:1) wurden hinzugefügt und der Zellaufschluss erfolgte in 3 x 60 Sekunden bei 30 Hz. Nach insgesamt 3 Minuten waren durch das Mikroskop keine intakten Zellen mehr erkennbar (Abb. 7).

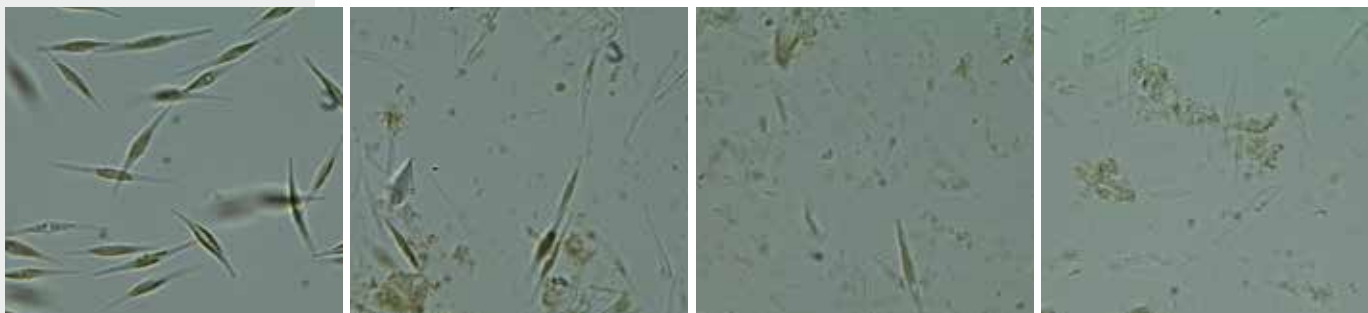


Abb. 7: *Phaeodactylum tricornutum* Zellen vor (links) und nach dem Zellaufschluss (rechts) in der Schwingmühle MM 400 in Kombination mit einem Adapter für Zentrifugenröhrchen, 3 x 60 Sek bei 30 Hz.

Verglichen mit der vorherigen Methode, bei der die French Press eingesetzt wurde, ist das Bead Beating in der MM 400 weniger zeitaufwändig, da 8 Proben gleichzeitig aufgeschlossen werden können, zudem ist das Risiko der Kreuz-Kontamination minimal. Der Vorteil der MM 400 gegenüber anderen Schüttlern sind die starken Scherkräfte, mit denen auch solche Zellen aufgeschlossen werden, bei denen das Bead Beating sonst nicht erfolgreich ist.

Homogenisierung von weichen und zähen biologischen Proben wie Sputum oder Leber

Manchmal ist die Homogenisierung von biologischen Proben so zäh wie das Material selbst. Die vielfach genutzten 2 ml Einweggefäße von Eppendorf sind oft nicht groß genug, um die vollständige Probenmenge aufzunehmen. Daher muss die Probe geteilt und nach der Homogenisierung wieder zusammengeführt werden, was einen zusätzlichen Zeitfaktor bei der Routinearbeit darstellt. Es gibt natürlich größere Mahlbecher, u. a. aus rostfreiem Stahl, welche die gesamte Probenmenge aufnehmen könnten, diese müssen aber nach der Nutzung gereinigt werden. Die perfekte Lösung für dieses Problem sind die neuen 5 ml Einweggefäße von Eppendorf. **Für die MM 400 bietet RETSCH jetzt einen Adapter an, der 5 dieser 5 ml Tubes aufnimmt, so dass 10 x 5 ml Probe simultan aufbereitet werden können.**

Die Beschaffenheit biologischer Proben ist sehr unterschiedlich und reicht zum Beispiel von sehr zähem Sputum von Patienten mit zystischer Fibrose bis zu Gewebeproben wie Lunge, Leber oder Tumor. Im Folgenden beschreiben wir den Einsatz der MM 400 mit dem neuen Adapter für 5 ml Gefäße für die Probenhomogenisierung.

Anwendung: Homogenisierung von sehr zähem Sputum

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. Wurde mit 2 ml Eppendorf Tubes gearbeitet, hatte das zwar den Vorteil der minimierten Kontaminationsgefahr, jedoch bestand der Nachteil des begrenzten Probenvolumens. Für die Probenaufbereitung in der Forschung wurde daher das sehr zähe und viskose Sputum in Portionen aufgeteilt und später wieder vereinigt, 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.

Der Einsatz der Adapter für die 5 ml Reaktionsgefäße erlaubt die Aufbereitung eines größeren Volumens ohne die Notwendigkeit zur anschließenden Reinigung. Bis zu 3 ml wurden mit 2 bis 3 Zirkonoxid Mahlkugeln (Ø 5 mm) bei 30 Hz für maximal 2,5 Minuten zerkleinert. Diese Methode reduziert nicht nur den Arbeitsaufwand erheblich, sondern auch den Umgang mit potenziell infektiösem Material.



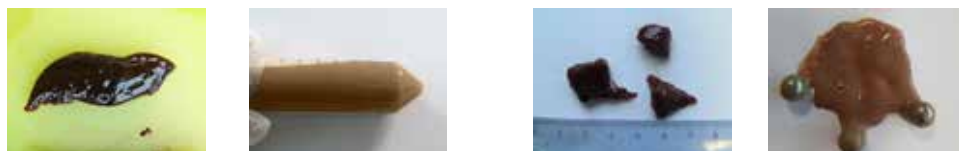
Abb. 8: Adapter MM 400 für fünf 5 ml tubes

Anwendung: Homogenisierung von Lebergewebe

Gewebeproben wie Lunge, Leber oder Tumore werden z.B. in der biologischen Grundlagenforschung, Toxikologie, Biomedizin, Pharmakologie, Molekular Diagnostik und vielen weiteren Bereichen routinemäßig homogenisiert und untersucht. Hier erlebt der Anwender die gleichen Probleme wie bei der Homogenisierung von zähem Sputum. Auch in diesen Fällen sind die 5 ml single-use Gefäße von Eppendorf in Kombination mit der Schwingmühle MM 400 von RETSCH eine ideale Alternative. Für die Homogenisierung von Leber wurden verschiedene 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 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 (Abb. 9).

Den gleichen Homogenisierungsgrad erreicht man in Zentrifugenröhrchen mit den folgenden Parametern: 4 Mahl­kugeln aus rostfreiem Stahl (20 mm) + 15 g Probe, Puffer, 30 Hz, 3 min. Aufgrund des Gewichts von Probe + Mahl­kugel + Puffer lassen sich nur 4 Proben gleichzeitig in den Zentrifugenröhrchen homogenisieren. Der Temperaturanstieg ist dabei sowohl in den 5 ml Tubes als auch in den Zentrifugenröhrchen minimal.

Abb. 9: Leberprobe vor und nach der Homogenisierung in der MM 400 (links: im Zentrifugenröhrchen, rechts: im 5 ml Eppendorf Tube)



Kryogenvermahlung von Zellpellets, Muskelgewebe und Kiefernadeln

Bei Proben wie faserigen Pflanzen, sehr zähen Venen, Fingernägeln, oder zäherem Gewebe ist die Homogenisierung in Pufferlösung nicht sehr effektiv. Die Kryogenvermahlung dagegen, also die Versprödung von Proben mit Flüssigstickstoff oder Trockeneis vor oder während der Zerkleinerung, ist eine sehr effektive Methode zur Gewinnung homogener Proben. Anders als beim Bead Beating Prozess ist die Methode des Einfrierens der Probe geeignet, um intrazelluläre Organellen aufzubrechen, z. B. bei Hefe. Dank der niedrigen Temperatur kommt es nicht zu einer Zersetzung z. B. von Proteinen und der Verlust leicht flüchtiger Bestandteile wird drastisch reduziert. Für klebrige Proben ist die Kryogenvermahlung oft die einzige Möglichkeit, eine homogene Probe zu produzieren. Tabelle 1 gibt einen Überblick über die Probenmaterialien, die mit der MM 400 oder der CryoMill erfolgreich kryogen pulverisiert wurden (siehe auch Abb. 10).

Tabelle 1: Biologische Proben homogenisiert mit kryogener Vermahlung

Probe	Zubehör	Probenmenge	Zeit	Frequenz	Endfeinheit
E. coli Bakterien	2 x 50 ml Mahlbecher, rostfreier Stahl, 2 x 25 mm Mahl­kugel, rostfreier Stahl	2 x 10 ml gefrorene Zell­pellets	2 min	30 Hz	vollständiger Zellaufschluss
Muskelgewebe	50 ml Mahlbecher, rostfreier Stahl, 1 x 25 mm Mahl­kugel, rostfreier Stahl	10 g	4 min	25 Hz	150 µm
Kiefernadeln	20 x 2 ml Reaktionsgefäße in 2 Adaptern für je 10 Reaktionsgefäße, 2 x 5 mm Mahl­kugel, rostfreier Stahl, pro Gefäß	2 Nadeln pro Gefäß	3 min	30Hz	Reproduzierbare RNA Extraktion von 20 Proben in einem Schritt
Klebrige Beeren	50 ml Mahlbecher, rostfreier Stahl, 4 x 15 mm Mahl­kugel, rostfreier Stahl	2 g	40 sek	20 Hz	200 µm
Fingernägel	- Adapter CryoMill für 4 x 2 ml Gefäße, 4 x Mahl­kugel, rostfreier Stahl à 5 mm ø pro Gefäß	1 Fingernagel pro Gefäß	2 min	25 Hz	200 µm
Rattendarm	35 ml Mahlbecher, rostfreier Stahl, 1 x 20 mm Mahl­kugel, rostfreier Stahl	1,8 g	2 min	30 Hz	150 µm

Abb. 10: Fleischstücke vor und nach der Kryogenvermahlung



Abb. 11: Klebrige Beeren vor und nach der Kryogenvermahlung

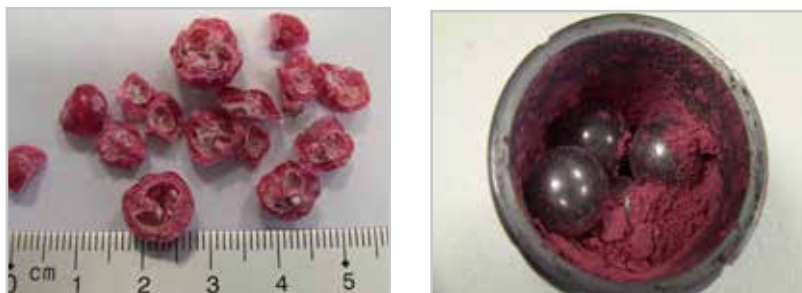


Abb. 12: Kiefernadeln vor und nach der Kryogenvermahlung (inkl. Agarosegel für die RNA Separation; hohe Reproduzierbarkeit, ausreichende Menge von aufbereiteter RNA nach der Vermahlung)



Geeignete Mühlen für die Kryogenvermahlung

Für kleine Probenmengen ist der Einsatz der MM 400 oder der **CryoMill** (Abb. 13) sehr effektiv. Geeignete Mahlbecher der MM 400 sind aus Stahl oder PTFE; außerdem können 1,5 ml und 2 ml Einweggefäße genutzt werden. Es ist darauf zu achten, dass kein Flüssigstickstoff in den Mahlbechern oder Reaktionsgefäßen eingeschlossen wird. Die bei der Vermahlung entstehende Wärme macht den Flüssigstickstoff gasförmig, was zu einem deutlichen Druckanstieg im Mahlbecher führt. Mithilfe einer Zange wird der geschlossene Mahlbecher für 2 bis 3 Minuten in einen mit LN₂ gefüllten Isolierbehälter getaucht und dann in die MM 400 eingespannt. Damit der hohe Energieeintrag und die daraus resultierende Reibungswärme die Probe nicht zu stark erwärmen und so das Bruchverhalten beeinträchtigen, sollte der Mahlprozess nicht länger als 2 Minuten dauern. Sollte mehr Zeit nötig sein, muss die Vermahlung durch Zwischenkühlungen des geschlossenen Mahlbechers unterbrochen werden.

Die **CryoMill** von RETSCH bietet den Vorteil der **kontinuierlichen Kühlung des Mahlbechers mit Flüssigstickstoff**, wodurch die Temperatur des Bechers und der Probe innerhalb von Minuten auf gleichbleibende -196 °C gesenkt wird. Die Temperatur bleibt auch bei längerer Mahldauer konstant. Wenn Zwischenkühlung erforderlich ist, können entsprechende Zyklen von Vermahlung und Kühlung programmiert werden. Der Mahlbecher bleibt währenddessen in der Mühle eingespannt, was die Handhabung sehr unkompliziert macht. Zudem kommt der Anwender zu keinem Zeitpunkt mit dem flüssigen Stickstoff in Berührung, so dass die Bedienung der CryoMill sehr sicher und bedienerfreundlich ist. Die automatische Vorkühlung stellt sicher, dass die Vermahlung nicht beginnt, bevor eine Temperatur von -196 °C erreicht und gehalten wird. Für die schwermetallfreie Zerkleinerung wird ein Mahlbecher aus Zirkonoxid genutzt.



Abb. 13: CryoMill mit 50 l Tank



Abb. 14: RETSCH bietet unterschiedliche Schneidmühlenmodelle an

Pulverisierung forensischer Proben: Knochen, Zähne, Haare

Forensische Materialien wie Haare, Knochen oder Zähne sind i. d. R. spröde und benötigen daher keine Kühlung vor der Zerkleinerung. Je nach gewünschter Endfeinheit müssen die Proben gegebenenfalls in einem **Backenbrecher** oder einer **Schneidmühle** vorzerkleinert werden, um Partikelgrößen zu erhalten, die für die Vermahlung in einer **Kugelmühle** geeignet sind ($<10\text{ mm}$). Schneidmühlen werden für die Vorzerkleinerung von Knochen eingesetzt, die frisch und eventuell nicht komplett getrocknet sind bzw. noch Fleischreste aufweisen. RETSCH bietet eine ganze Schneidmühlenfamilie für die Zerkleinerung weicher, mittelharter, zäher und faseriger Proben an. Die große Auswahl an Zubehör erlaubt die perfekte Anpassung an eine Vielzahl unterschiedlicher Applikationen. Die SM 300 kann mit 3 verschiedenen Rotoren und mit Bodensieben von $0,25\text{ mm}$ bis 20 mm ausgestattet werden.

Im Gegensatz zu den frischen lassen sich trockene Knochen auf eine Feinheit von $<0,25\text{ mm}$ in ein bis zwei Schritten zerkleinern. Zur optimalen Anpassung an das Bruchverhalten und die Temperaturempfindlichkeit der Probe verfügt die SM 300 über eine variable Drehzahl von 100 bis 3000 min^{-1} und ist zudem kraftvoll genug, auch sehr zähe Knochen zu vermahlen.

Anwendungsbeispiel Knochen

Im folgenden Beispiel wurden 700 g Knochen in der SM 300 mit einem 6-Scheiben-Rotor und einem Bodensieb mit Öffnungsweite 6 mm vorzerkleinert. Nach ungefähr 30 Sekunden Zerkleinerung bei 3000 min^{-1} wurden Partikelgrößen unter 6 mm erzielt (Abb. 15).



Abb. 15: Knochen vor und nach der Zerkleinerung in der SM 300

Die Pulverisierung von Knochen oder Zähnen erfolgt üblicherweise in Kugelmühlen mit größeren Mahlkugeln ($>5\text{ mm}$) aus rostfreiem Stahl, Zirkonoxid oder Wolframkarbid. Die großen Mahlkugeln haben genug Zerkleinerungsenergie, um sehr harte Proben durch Prall zu zerkleinern. Die vorzerkleinerten Knochen aus dem obigen Beispiel wurden anschließend in einer MM 400 pulverisiert. 1 g Probe wurde mit einer 20 mm Mahlkugel aus Zirkonoxid in einen 35 ml Mahlbecher aus dem gleichen Material gegeben. Nach 2 min bei 30 Hz war die Probe auf eine Feinheit unter $200\text{ }\mu\text{m}$ vermahlen und somit für die Extraktion von Nukleinsäuren bereit (Abb. 15). Ist die Probe sehr zäh, kann eine Versprödung mit Flüssigstickstoff zur Verbesserung der Bruch Eigenschaften sinnvoll sein.

Anwendungsbeispiel Zähne

Ein weiteres Beispiel ist die Aufbereitung von Zähnen. 1 Zahn wurde in einen 25 ml Mahlbecher aus Zirkonoxid gegeben und unter Verwendung einer 20 mm Mahlkugel aus demselben Material pulverisiert. Nach 3 min bei 30 Hz in der MM 400 wies die Probe eine Partikelgröße von überwiegend $<100\text{ }\mu\text{m}$ auf (Abb. 16, rechts).



Abb. 16: Zähne vor und nach der Vermahlung in der Schwingmühle MM 400

Anwendungsbeispiel Haare

Die MM 400 und CryoMill eignen sich auch hervorragend zur Vermahlung von faserigen Proben wie Haaren. Interessanterweise muss gesundes Haar oft kryogen vermahlen werden, während ungesundes Haar sich leicht bei Raumtemperatur zerkleinern lässt. Im Gegensatz zu den eher kompakten Knochen und Zähnen **wird Haar am besten mit kleinen Mahlkugeln zerkleinert, da für diesen Prozess eher Reibung als Prall benötigt wird.** Dabei sollte die Mahldauer möglichst kurz gehalten werden, da die Proben leicht verbrennen.

1 g Haar wird in einem 25 ml Mahlbecher aus rostfreiem Stahl mit 6 Mahlkugeln à 10 mm aus demselben Material vermahlen. Nach 2 min bei 25 Hz liegt die Feinheit der Probe bei <160 µm (Abb. 17, rechts), was für die nachfolgende Analytik (z.B. auf Drogenkonsum) ausreichend ist.

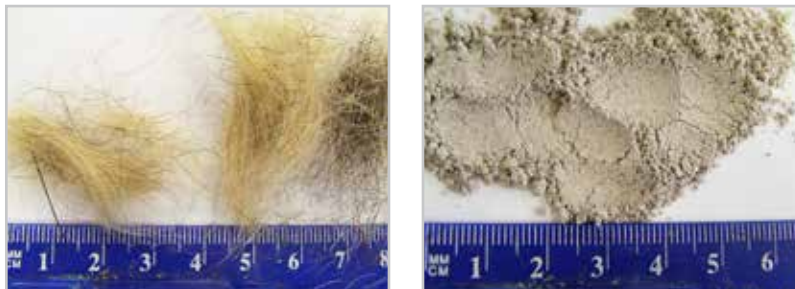


Abb. 17: Menschliches Haar vor und nach der Vermahlung in der MM 400

Unterschiedliche forensische Proben lassen sich problemlos mit RETSCH Møhlen zerkleinern, z. B. für die anschließende Analytik oder Extraktion von Nukleinsäuren. Auch größere Proben wie ganze Knochen lassen sich mit der richtigen Vorzerkleinerung gut aufbereiten.

Neue Methode zum Abwaschen intakter Bakterienzellen von menschlichem Gewebe

Eines der Hauptrisiken des Gelenkersatzes ist die prothetische Gelenkinfektion (PJI), eine bakterielle Infektion an der Schnittstelle von Implantat, Gewebe und Knochen. Bei den Hüftgelenksimplantaten kommt es innerhalb der ersten 2 Jahre nach der ersten Operation in <1% aller Fälle zur Infektion, bei Kniegelenksersatz sind es <2% und bei Ellbogenersatz sogar <7%. Es wird jedoch davon ausgegangen, dass einige Infektionen als aseptische Revisionen klassifiziert werden, so dass der Prozentsatz der PJI deutlich höher ausfällt. PJI kann innerhalb von 3 Tagen nach der Operation auftreten, aber auch noch Jahre später. Da die Infektion von sehr unterschiedlichen Mikroorganismen verursacht werden kann, ist die Klassifizierung für qualitative Therapien sehr komplex. Je nach angewandter Methode ist die Dokumentationsrate leider begrenzt; in vielen Fällen kann die Infektion nicht mit traditionellen Methoden dokumentiert werden. Hier kommt die Schwingmühle MM 400 ins Spiel. Das Verfahren ist sehr einfach: Keime werden von Gewebeproben mit 20 ml sterilem Wasser und 5 ml Glaskugeln à 1 mm bei 30 Hz in einem autoklavierten Stahlbecher in der MM 400 innerhalb von 210 Sekunden abgewaschen. Für diese Prozedur werden sterile 30 ml Einwegflaschen verwendet, welche sich direkt in die Schwingmühle einspannen lassen oder in einen Adapter der 4 dieser Flaschen pro Mahlstelle aufnehmen kann. Der Überstand kann dann entweder auf Platten zur Inkubation ausgestrichen oder direkt in Flüssigmedium kultiviert werden. Auch eine Diagnostik mittels PCR (Polymerase Chain Reaction) ist möglich. Mit dieser Methode nach A.-L. Roux et. al (2010)* wird eine gute Dokumentationsrate erzielt. Sie kann im Prinzip für jedes infizierte Gewebe genutzt werden, auch wenn kein Implantat vorliegt.

Eine detaillierte Beschreibung des Verfahrens finden Sie hier:

A.-L. Roux, V. Sivadon-Tardy, T. Bauer, A. Lortat-Jacob, J.-L. Herrmann, J.-L. Gaillard and M. Rottman: Diagnosis of prosthetic joint infection by beadmill processing of a periprosthetic specimen; Clinical Microbiology and Infection, 2010, European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, CMI, 17, 445–450.

Schwingmühle MM 400: der Allrounder im Labor

Die Schwingmühle MM 400 von RETSCH ist vielfältig einsetzbar dank einer umfangreichen Auswahl an Zubehör (Bild 1). Sie eignet sich hervorragend für den Zellaufschluss in Einweg-Reaktionsgefäßen, wie z. B. den 50 ml Zentrifugenröhrchen oder kleineren Gefäßen, z. B. von Eppendorf (0,2 / 1,5 / 2 / 5 ml). Die MM 400 zerkleinert eine große Vielfalt von harten, mittelharten, spröden und weichen, elastischen oder faserigen Probenmaterialien, z. B. Pflanzen, Kiefernadeln, Federn, Knochen, Zellgewebe, pharmazeutische Produkte, Holz, Mineralien oder Chemikalien. Sie arbeitet mit einer Schwingfrequenz von maximal 30 Hz und erzielt Feinheiten bis 5 µm.

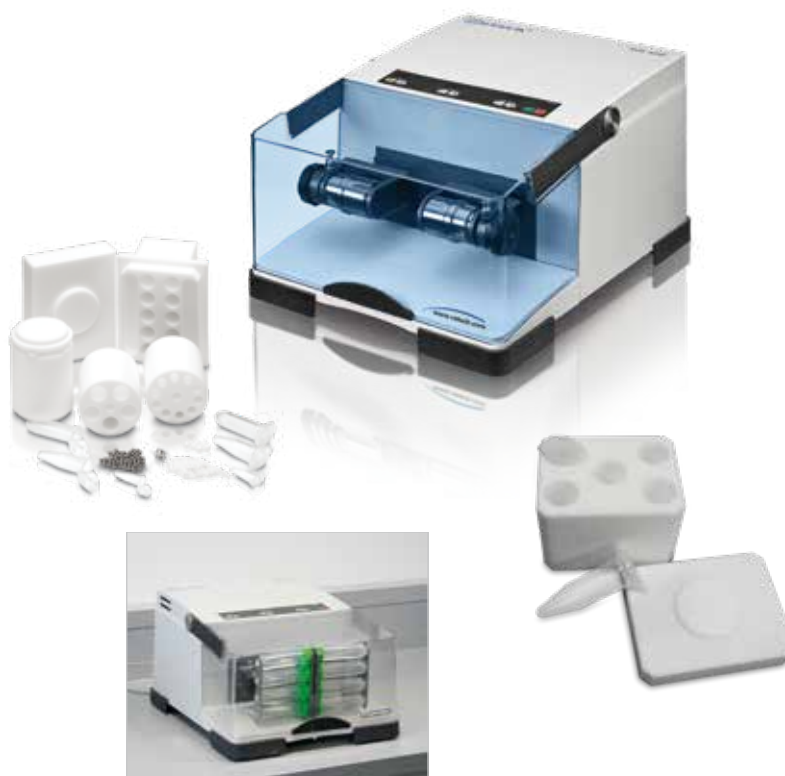


Abb. 18: Schwingmühle MM 400 mit Adapter für 8 x 50 ml Zentrifugenröhrchen (unten) und weiteren Adaptern für Einweg-Reaktionsgefäße

Fazit

Vom „Bead Beating“ für den Zellaufschluss über die Pulverisierung und Homogenisierung bis hin zur Kryogenvermahlung – RETSCH bietet zuverlässige und komfortable Lösungen für die Probenvorbereitung in Bereichen wie Biotechnologie, Diagnostik, Forensik, Mikrobiologie und Agrarwissenschaften.

Weitere Informationen und Produktvideos finden Sie hier:

www.retsch.de/mm400

www.retsch.de/cryomill