



Versuch Immunfluoreszenz

1. Hintergrund zur Methode: Warum ist Immunfluoreszenz wichtig?
2. Hintergrund zum Untersuchungsgegenstand: Mikrotubuli als Ziel neuer Wirkstoffe?
3. Fragestellung des Versuchs
4. Hintergrund zur Durchführung: was sollen die einzelnen Schritte?
5. Wie funktioniert ein Fluoreszenzmikroskop?
6. Wie funktioniert ein Konfokalmikroskop?
7. Ein paar Grundregeln fürs Mikroskop
8. Lösungen und Puffer (mit Rechenblatt)
9. Versuchsanweisung
10. Referenzen

1. Hintergrund zur Methode: Warum ist Immunfluoreszenz wichtig?

Die moderne Biologie ist stark durch die Fortschritte der Molekularbiologie geprägt. Für zahlreiche Organismen wurden inzwischen die gesamten Genome entschlüsselt und damit das gesamte Repertoire von Proteinen aufgeklärt. Freilich kennt man nur für einen Teil dieser Proteine ihre biologische Rolle. Für viele Proteine weiss man nicht, "wofür sie gut sind", für andere wurde aufgrund von Sequenzhomologien zu Proteinen aus anderen Organismen eine mögliche Funktion zugeordnet, aber oft ist diese Zuordnung (Annotierung) falsch oder gar unsinnig (was machen Sie zum Beispiel mit der Aussage, dass Ihr in der Maus identifiziertes Protein eine Homologie zu einem photosynthetischen Protein trägt?).

Um die Funktion eines Proteins erschliessen zu können, werden in der Regel drei Wege beschritten:

1. Man schaltet das Protein aus (sogenannter *loss-of-function* Ansatz) und untersucht, welche Funktion des Organismus dann gestört ist.
2. Man führt eine Überexpression des Proteins herbei (sogenannter *gain-of-function* Ansatz) und sucht nach veränderten Funktionen.
3. Man untersucht, wo das Protein im Organismus oder in der einzelnen Zelle vorkommt und schliesst darauf auf seine Funktion.

Der dritte Ansatz beruht auf der Verbindung von Mikroskopie und molekularem Nachweis. Zellbiologie wurde über Jahrzehnte als strukturelle Wissenschaft verstanden - man untersuchte Form, Aufbau und Dynamik von Geweben oder Zellen. Darüberhinaus gibt es jedoch auch die Möglichkeit, Aufschluß über die molekulare Natur des Präparats zu erhalten. In der klassischen Zellbiologie bedient man sich dazu der spezifischen Anfärbung bestimmter Zellbestandteile – beispielsweise lassen sich Zellkerne mit Giemsa oder Methylenblau sichtbar machen, oder die Vakuole mit Neutralrot. Durch den Einsatz von Antikörpern kann man nun aber fast jedes beliebige Biomolekül in der Zelle spezifisch nachweisen (Immunocytochemie). Im Grunde ist Immunfluoreszenz eine Art **Western-Blot** (den wir Ihnen in einem anderen Versuch nahebringen) unter dem Mikroskop.

Damit wurde es möglich, ganz gezielt ein bestimmtes Protein innerhalb der Zelle zu markieren. Der Antikörper muß dann nur noch in irgendeiner Weise sichtbar gemacht werden. Seit Beginn der 80er Jahre verwendet man dazu immer häufiger fluoreszierende Substanzen (sogenannte Fluorochrome), die an Antikörper gekoppelt werden können. Diese Methode wird daher **Immunfluoreszenz** genannt. Seit ihren Anfängen vor knapp drei Jahrzehnten hat sich die Immunfluoreszenz neben den **Fluoreszenten Proteinen** (FP, die werden in einem anderen Versuch vorgestellt) zu einer der Schlüsseltechnologien der modernen Zellbiologie, aber auch der medizinischen Diagnostik gemausert. Im Gegensatz zur FP-Technologie müssen für die Immunfluoreszenz keine genetischen Transformationen durchgeführt werden, die untersuchte Zelle muss also nicht zuvor gentechnisch manipuliert werden. Für viele Organismen, die molekulargenetisch nicht zugänglich sind, ist Immunfluoreszenz daher nach wie vor die einzige Möglichkeit, die Lokalisation eines bestimmten Proteins zu bestimmen.

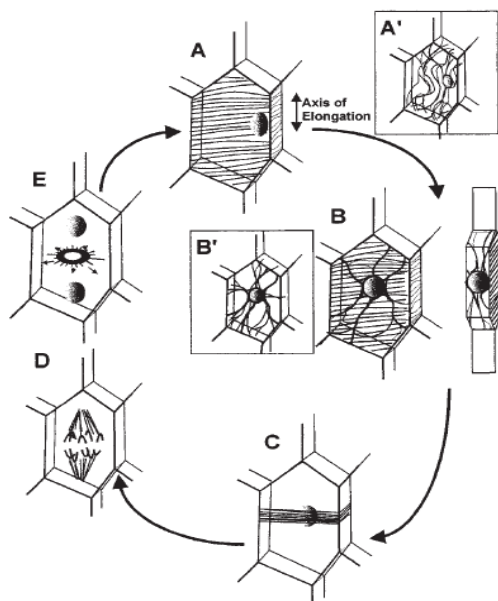
2. Hintergrund zum Untersuchungsgegenstand: Mikrotubuli als Ziel neuer Wirkstoffe?

Mikrotubuli bilden gemeinsam mit Actinfilamenten (und bei tierischen Zellen auch noch den Intermediärfilamenten) das sogenannte Cytoskelett (Zellskelett). Die Anfärbung von Mikrotubuli über Immunfluoreszenz ist daher eine zentrale Technik in der medizinischen Forschung, zum Beispiel für Tumorbiologie und neurodegenerative Erkrankungen.

Mikrotubuli sind daher ein zentrales Ziel für die Entwicklung neuer **Medikamente**. Vor allem die sich unkontrolliert teilenden Krebszellen kann man mithilfe von Mikrotubuli-Wirkstoffen wieder zur Raison bringen. Diese sogenannte Chemotherapie hat jedoch den Nachteil, dass auch die anderen Zellen des Patienten betroffen sind und dadurch unangenehme Nebenwirkungen entstehen, wodurch die Lebensqualität stark eingeschränkt wird. Mit Hochdruck sucht man daher weltweit nach neuen Wirkstoffen, womit man die Mikrotubuli der Krebszellen angreifen kann, ohne die Mikrotubuli der anderen Körperzellen in Mitleidenschaft zu ziehen.

Neben der allseits bekannten Rolle bei der Kernteilung sind sie auch für viele **innerzelluläre Transportvorgänge** und für die Architektur des Cytoplasmas wichtig. Die Bedeutung dieser Interphase-Funktion der Mikrotubuli wird zum Beispiel sichtbar, wenn durch eine Störung in der Signalverarbeitung das Mikrotubuli-assoziierte Protein (MAP) Tau aggregiert und sich von den Mikrotubuli unserer Neuronen ablöst – die Neuronen degenerieren und der Betroffene erkrankt an **Alzheimer**. Wir empfehlen Ihnen, sich nochmal die entsprechenden Kapitel aus der Vorlesung „Grundlagen der Biologie“ (Teil Zellbiologie) anzuschauen – das ist biologisches Grundwissen!

Eine spezifische Wirkung zu finden ist gar nicht so einfach: die Grundbausteine der Mikrotubuli, α - und β -Tubulin, sind nämlich **hochkonserviert**. Ein Wirkstoff, der also direkt an den Mikrotubuli angreift, sollte daher alle Mikrotubuli angreifen. Zum Glück hat die Evolution aber für ein hohes Maß an Spezifität gesorgt – freilich liegt die nicht im Tubulin selbst, sondern in der Vielzahl von assoziierten Proteinen (wie das oben erwähnte MAP Tau), die dafür sorgen, dass die Mikrotubuli einer Zelle unterschiedliche Funktionen ausüben können. Pflanzen unterscheiden sich hierbei deutlich von tierischen Zellen und ein Ansatz besteht nun darin, nach Wirkstoffen zu suchen, die auf pflanzliche Mikrotubuli eine spezifische Wirkung ausüben können. Interessanterweise stammen die meisten Wirkstoffe aus Pflanzen, so etwa der Wirkstoff **Taxol** aus der Rinde der Pazifischen Eibe *Taxus baccata* mit einem globalen Marktvolumen von derzeit 2 Mrd €. Im Rahmen des Versuchs sollen neue Wirkstoffe pflanzlichen Ursprungs untersucht werden, bevorzugt solche, die auf die verschiedenen Mikrotubuli der Pflanzenzelle unterschiedlich einwirken (wegen der Spezifität).



In Pflanzenzellen gibt es neben der allfälligen Mitosespindel, die Sie aus der Grundvorlesung kennen, auch noch andere Mikrotubuli-Strukturen, die andere Funktionen ausüben (**Abb. 1**): In der Interphase sind die **corticalen Mikrotubuli** quer zur Wachstumsachse der Zelle orientiert (A) und bestimmen die Ausrichtung der Cellulosefasern (und damit die Mechanik der Zellwand). Vor der Teilung sind Mikrotubuli an der **Wanderung des Zellkerns** in die Zellmitte beteiligt (B). Danach bildet sich das **Präprophaseband** (C), was die Orientierung der späteren Teilungsebene bestimmt. Die **Spindel** (D) bildet sich immer senkrecht dazu. Nach vollzogener Kernteilung entsteht dort, wo vorher das Präprophaseband war, ein Ring aus Mikrotubuli, der **Phragmoplast** (E), der die Vesikel mit Zellwandmaterial in die Zellmitte transportiert, wo sie zur neuen Querwand verschmelzen, die dann immer größer wird, bis die beiden Tochterzellen voneinander geschieden sind.

Abb. 1: Mikrotubuli-Strukturen von Pflanzenzellen. A corticale Mikrotubuli, B radiale Mikrotubuli, C Präprophaseband, D Teilungsspindel, E Phragmoplast. A' zeigt die Anordnung der Actinfilamente (aus Nick 1999). Signals, Motors, Morphogenesis - the Cytoskeleton in Plant Development. Plant Biol 1, 169-179)

Wenn man nun also einen Wirkstoff prüft, kann man in Pflanzenzellen nach Effekten suchen, die vor allem bei bestimmten Mikrotubuli-Strukturen auftreten und kann dann davon ausgehen, dass dieser Wirkstoff nicht auf das Tubulin direkt einwirkt, sondern auf die assoziierten Proteine. Solche Wirkstoffe sind gute Kandidaten für Spezifität.

3. Fragestellung des Versuchs

Der Versuch hat zwei Ziele:

1. Methodisch: Sie sollen an einem Beispiel die zentrale Technik der **Immunfluoreszenz** von der Pike auf erlernen und durchführen.
2. Wissenschaftlich: Sie sollen pflanzliche **Naturstoffe** auf eine mögliche Wirkung auf pflanzliche Mikrotubuli prüfen. Besonders interessant sind Wirkstoffe, die eine spezifische Wirkung zeigen, wo also der Effekt auf die verschiedenen pflanzlichen Mikrotubuli-Strukturen möglicherweise unterschiedlich ist.
3. Sie sollen an diesem Beispiel sich auch mit der Konzeption eines wissenschaftlichen Experiments vertraut machen, vor allem mit dem Konzept der **Positiv- und Negativkontrolle**.

Praktisch sieht es so aus, dass in jeder Versuchswoche jeweils ein unterschiedlicher Wirkstoff untersucht wird. Informationen zum jeweiligen Hintergrund werden zu Beginn des Versuchs ausgehändigt. Je nach Zahl der Studierenden werden in einer Versuchswoche 3-4 parallele Ansätze untersucht. Die Ergebnisse der Teams sollten untereinander ausgetauscht werden:

Negativkontrolle: Damit wird die Qualität der Immunofluoreszenz überprüft. Es können ja Fehler passieren (z.B. wenn man einen Antikörper vergisst) oder die Mikrotubuli könnten durch wenig schonende Handhabung (vor allem beim Pipettieren) zerstört werden. Dann wäre die Beobachtung, dass die im selben Experiment untersuchte Substanz X Mikrotubuli zerstört, wenig aussagekräftig. Also wird ein Ansatz unbehandelte Zellen enthalten. Diese Negativkontrolle zeigt also an, wie gut Sie Ihr Handwerk beherrschen...

Positivkontrolle: Um beurteilen zu können, ob ein etwaiger Wirkungseffekt nun „stark“ oder „schwach“ zu bewerten ist, brauchen wir eine Referenz, wo wir einen „starken“ Effekt sehen. Nur so bekommen wir einen Vergleich. Als Positivkontrolle setzen wir einen Wirkstoff ein, von dem wir wissen, dass er die Mikrotubuli eliminiert. Hierfür verwenden wir das pflanzliche Herbizid Oryzalin in einer Konzentration von 10 μM .

Eigentliche Probe: Das ist das, was wir uns nun eigentlich ansehen möchten. Hierbei ist natürlich immer die Frage, was die richtige Konzentration sei. Bei einem neuen Wirkstoff kennt man die nicht. Aber man kann sich behelfen, wenn man mal anschaut, in welchen Konzentrationen bekannte Mikrotubuli-Wirkstoffe eingesetzt werden. Das liegt gewöhnlich im Bereich 10-100 μM und damit kann man ja mal loslegen. Im Fall, dass es so viele Studierende sind, dass 4 Zweierteams gebildet werden müssen, kann man noch eine zweite Konzentration (z.B. 10 x niedriger) ausprobieren. Generell gilt: je weniger man braucht, umso spezifischer ist die Wirkung (und – nicht zu vergessen – umso wirtschaftlicher der Einsatz eines solchen Wirkstoffs in der Praxis).

4. Hintergrund zur Durchführung: was sollen die einzelnen Schritte?

Die Immunfluoreszenz gibt es prinzipiell in zwei Ausführungen: als **direkte** und als **indirekte Immunfluoreszenz**. Bei der direkten Immunfluoreszenz ist das Fluorochrom unmittelbar an den Antikörper gekoppelt. Bei der viel häufiger eingesetzten indirekten Immunfluoreszenz benutzt man zwei Antikörper, einen **primären Antikörper**, der das gewünschte Molekül im Präparat erkennt und daran bindet und einen **sekundären Antikörper**, der gegen den primären Antikörper gerichtet ist und die Fluoreszenz trägt.

Im Folgenden sei die indirekte Immunfluoreszenz beschrieben.

(i) Zunächst einmal muß man die Zelle in möglichst gut in dem Zustand erhalten – so wie sie in dem Moment war, als man mit der Präparation anfing. Dazu werden die Zellen **fixiert**. Als Fixans benutzt man in der Regel Aldehyde (Formaldehyd oder Paraformaldehyd für eine milde Fixierung, Glutaraldehyd für starke Fixierung). Diese **vernetzen** die Zellproteine und stabilisieren sie dadurch. Außerdem wird die Zelle abgetötet und kann sich während der Färbeprozedur nicht mehr verändern. Um die Fixierung zu verbessern und die Membran zu **permeabilisieren**, werden oft **Detergentien** wie DMSO, Triton oder Nonidet dem Puffer zugesetzt.

(ii) Nachdem das Fixans ausgewaschen wurde, wird das Gewebe geschnitten, um das Zellinnere freizulegen. Hierfür gibt es verschiedene Möglichkeiten, die vom geschickten Freihandschnitt mit einer Rasierklinge über Vibratome bis zur Einbettung und Mikrotomie oder Kryotomie reichen. Im Falle von Zellkulturen muß natürlich nicht geschnitten werden – hier hat man dafür mit dem Problem zu kämpfen, daß die Zellen bei der ganzen Prozedur nicht verloren gehen. Wir haben hierfür kleine Färbekammerchen erfunden.

(iii) Nun wird mithilfe einer milden Cellulasebehandlung die Zellwand etwas anverdaut, damit die Antikörper besser eindringen können. Danach wird mit Serumalbumin **geblockt** – damit sollen „klebrige“ Stellen im Präparat (z.B. Pectine in der Zellwand oder Stärke) mit Protein abgesättigt werden, damit der primäre Antikörper nicht unspezifisch an diesen Stellen hängen bleibt.

(iv) Danach wird mit dem **primären Antikörper** inkubiert – dieser bindet an das gesuchte Protein. Ungebundener Antikörper wird im Anschluß an die Inkubation abgewaschen.

(v) Um den primären Antikörper sichtbar zu machen, wird das Präparat nun mit dem **sekundären Antikörper** inkubiert, der gegen den primären Antikörper gerichtet ist. Der sekundäre Antikörper trägt das **Fluorochrom**. An den Stellen, wo sich das gesuchte Protein befindet und also der primäre Antikörper gebunden hat, wird nun über den sekundären Antikörper das Fluorochrom angeheftet.

(vi) Mithilfe eines **Fluoreszenzmikroskops** kann nun das Fluorochrom sichtbar gemacht werden (siehe unten).

In fortgeschritteneren Varianten dieser Methode lassen sich auch verschiedene Proteine gleichzeitig mit verschiedenen primären Antikörpern inkubieren. Wenn man sekundäre Antikörper zur Verfügung hat, die zwischen diesen primären Antikörpern zu unterscheiden vermögen und an verschiedene Fluorochrome gekoppelt sind, kann man dann in ein- und derselben Zelle verschiedene Proteine mit verschiedenen Farben sichtbar machen (Doppel- oder **Polychrom-Immunfluoreszenz**). Hierbei muss man auf sogenannte *Artefakte* achten (methodische Probleme, die einem etwas Falsches vorgaukeln) – in diesem Falle sind vor allem **Kreuzreaktionen** der Antikörper problematisch und müssen mit entsprechenden **Negativkontrollen** überprüft werden.

Trotz dieser Problematik (die übrigens für fast alle modernen und häufig recht komplexen Methoden gegeben ist...) hat sich die Immunfluoreszenz zu einem der wichtigsten zellbiologischen Methoden entwickelt. Der Witz dabei: man kann sozusagen Biochemie auf dem Objektträger betreiben, also die räumliche Verteilung von ganz bestimmten Molekülen untersuchen.

Zum Nachdenken

A. Wieso wird Immunfluoreszenz vor allem als indirekte Immunfluoreszenz durchgeführt?

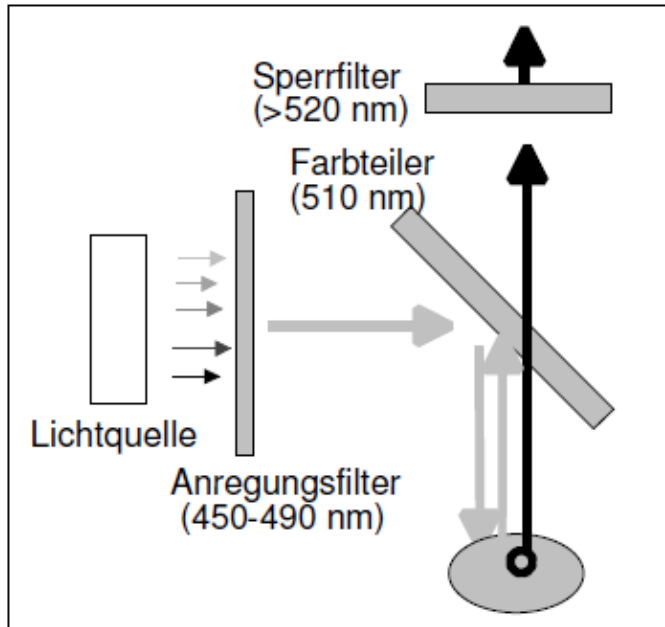
B. Wie kann man überprüfen, ob das beobachtete Signal tatsächlich die Verteilung des untersuchten Proteins widerspiegelt und nicht durch unspezifische Bindung verursacht ist?

C. Was ist die Voraussetzung, daß man mit einem bestimmten Antikörper Immunfluoreszenz durchführen kann? Wie können Sie das überprüfen?

D. Sie haben bei einer Ihrer Proben vergessen, den primären Antikörper zuzufügen, bemerken jedoch beim Mikroskopieren, dass das Muster zwar von den Proben mit Antikörpern abweicht, aber dass es dennoch leuchtet. Wie erklären Sie sich das?

5. Wie funktioniert ein Fluoreszenzmikroskop?

Die Lichtquelle (klassisch: eine Quecksilber-Hochdruckdampfampe, inzwischen oft ein Diodenarray) erzeugt einen möglichst großen Bereich von Anregungswellenlängen. Daraus wird mithilfe des Anregungsfilters eine einzige Wellenlänge isoliert (in **Abb. 2** beispielsweise Blaulicht). Diese trifft nun auf einen sogenannten Farbteiler. Der Farbteiler ist ein halbdurchlässiger Spiegel, der kurzwelliges Licht reflektiert, langwelliges Licht jedoch durchläßt (er teilt das Licht also in zwei verschiedenfarbige Strahlen auf, daher der Name). Das kurzwellige Anregungslicht wird also reflektiert und durch das



Objektiv (das hier gleichzeitig als Kondensordient) auf das Präparat eingestrahlt. Dort wird nun das Fluorochrom (beispielsweise das Fluorescein-Isothiocyanat, FITC) angeregt und fluoresziert nun längerwellig. Das Fluoreszenzlicht kommt nun wieder zurück zum Farbteiler, wird aber, da es längerwellig ist, durchgelassen. Daneben gibt es (viel mehr) blaues Licht, das auf kein Fluorochrom-Molekül getroffen ist und einfach reflektiert wurde. Dieses Licht wird vom Farbteiler jedoch nicht durchgelassen, da es kürzerwellig ist. Es läuft sich im Tubus tot. Das Fluoreszenzlicht wird dann noch über einen Sperrfilter weiter gefiltert. Das ist vor allem dann wichtig, wenn man das Präparat mit verschiedenen Fluorochromen angefärbt hat und diese unterscheiden will. Man erhält ein lichtschwaches, aber spezifisches Signal.

Abb. 2: Vereinfachter Aufbau eines Fluoreszenzmikroskops am Beispiel eines FITC Filtersatzes.

Zum Nachdenken

- Notorsche Fluoreszenzmikroskopiker lassen sich daran erkennen, daß sie oft nicht mehr wissen, wie man ein Mikroskop kühlt. Warum?
- Fluoreszenzobjektive sind sehr teuer, da die Linsen nicht aus Glas, sondern aus Flußspat gefertigt sind. Wozu der Aufwand?
- Warum sind Fluoreszenzobjektive viel „dicker“ als gewöhnliche Objektive (und haben sehr große numerische Aperturen)?
- Warum benötigen die meisten Fluoreszenzobjektive Ölimmersion?
- Warum wird Fluoreszenzmikroskopie als Epi- (=Auflicht) und nicht als Durchlicht-Fluoreszenzmikroskopie betrieben?

6. Wie funktioniert ein Konfokalmikroskop?

Im Grunde so wie ein gewöhnliches Fluoreszenzmikroskop auch. Der Unterschied besteht vor allem darin, daß das Bild nicht mehr **simultan** in unserem Auge entsteht, sondern **sequentiell** Pixel für Pixel von einem Bildverarbeitungsprogramm aufgebaut wird. Als Lichtquelle dient ein Argon-Krypton-Laser, der drei Anregungswellenlängen (Blau, Grün, Rot) zur Verfügung hat und mithilfe zweier rotierender Spiegel die Oberfläche des Präparats Punkt für Punkt abtastet. Farbteiler und Sperrfilter unterscheiden sich nicht von denen in einem konventionellen Fluoreszenzmikroskop.

Der Witz des Konfokalmikroskops liegt in einem winzigen Loch, der **konfokalen Lochblende**, die alles Licht, was nicht ganz genau aus der Brennebene stammt, rigoros ausblendet (dieses wird ja unter einem leicht verschiedenen Winkel gebrochen als das Licht aus der Brennebene). Das Prinzip dieser Lochblende ist in **Abb. 3** gezeigt. Damit wird also alle diffuse Hintergrundfluoreszenz ausgefiltert und es wird möglich, ein Präparat optisch in Scheiben zu „schneiden“ und einen sogenannten **z-Stapel** aus Einzelscheiben zu gewinnen. Diese Scheiben können sehr dünn sein. Nachteil dabei: das ohnehin schon schwache Fluoreszenzlicht wird noch weiter geschwächt (dafür gewinnt man eine weitere Ebene der Spezifität, nämlich die Auflösung in der Z-Achse).

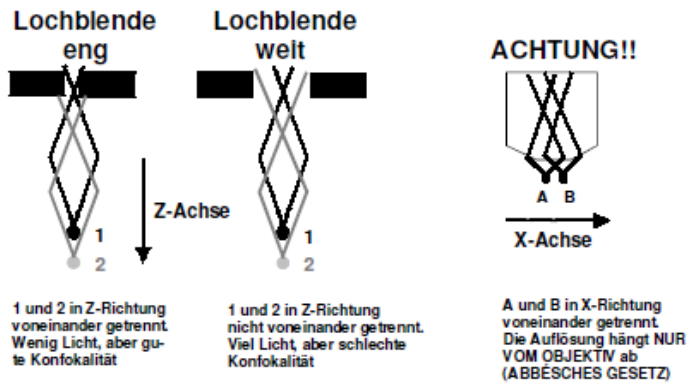


Abb. 3: Funktionsweise der konfokalen Lochblende.

Darum muß das menschliche Auge durch einen Photomultiplikator ersetzt werden, der dann für jeden Rasterpunkt das Signal mißt und hochverstärkt. Über Bildverarbeitung wird das Bild dann punktweise zusammengesetzt. Durch das Wegfiltern des Hintergrunds werden zelluläre Details sichtbar, die sonst nicht zu sehen wären. Die Deutung solcher Bilder erfordert jedoch sehr viel Erfahrung und hier gibt es leider viel Stümperei. Konfokalmikroskopie erlaubt also

ein Vordringen in die **dritte Dimension**. Begrenzender Faktor ist vor allem die Rechenleistung. ABER: nur eine gute Optik liefert gute Bilder, daran ändern die schnellsten Rechner nichts. Da das Abrastern eines Präparats mit dem Lichtstrahl relativ lange dauert, wird das Rastern in der neuesten Generation von Konfokalmikroskopen mithilfe von vielen parallelen Strahlen durchgeführt. Diese werden in einer komplexen Weise mithilfe einer sich schnell drehenden Lochscheibe mit vielen konfokalen Lochblenden erzeugt (sogenannte *spinning disc Mikroskopie*).

Zum Nachdenken

- Was begrenzt die „Auflösung“ zweier Punkte in der z-Achse (also, wie nahe können 1 und 2 sein, damit sie noch als getrennt wahrgenommen werden können)?
- Gibt es auch Nachteile gegenüber konventionellen Fluoreszenzmikroskopen?
- Gewöhnlich wird ein Bild nicht nur einmal, sondern mehrfach abgerastert und die (an sich identischen) Bilder werden dann überlagert (sogenanntes averaging). Warum wohl?

7. Grundregeln für das Mikroskop

Die Mikroskope sind sehr teuer (zwischen 100 und 500 k€). Sie bekommen eine Einführung in das jeweilige Mikroskop. Ohne eine solche Einführung darf keiner ran!

Was nicht passieren sollte:

- Scharfstellen: vor allem bei höheren Objektiven: seitlich schauen und das Objektiv dem Deckglas nähern. Dann Hineinschauen und den Fokus vom Deckglas weg drehen, bis man scharf sieht. **NIE UMGEKEHRT!!!** Ein vom Deckglas zerkratztes Fluoreszenzobjektiv kostet zwischen 3000 und 6000 € !!!
- Immersionsöl: nach Gebrauch die Frontlinse des Objektivs mit einem Linsentuch säubern. Vergessenes Immersionsöl verharzt nach wenigen Tagen und zerfrißt bewegliche Teile.
- Objektivwechsel: nicht mit den Fingern in die Frontlinse, beim Wechsel zu höheren Objektiven darauf achten, daß die Frontlinse beim Eindrehen nicht am Objektträger scheuert, am besten den Arbeitsabstand vergrößern und neu fokussieren. Am spinning disc und am laser tweezer Automatik benutzen.

Womit man sich viel Ärger sparen kann:

- Okulare mit Isopropanol vom Wimpernfett reinigen (hilft gegen „neblige“ Bilder).
- Darauf achten, daß der Polarisationsfilter nicht eingeschoben ist – das gibt sehr dunkle Bilder...

Richtig „KÖHLERN“ (für Differential-Interferenz-Kontrast oder Hellfeld) – So wird es gemacht

Objekt scharfstellen, Leuchtfeldblende (im Mikroskopfuß) schließen, den Kondensor mit dem Kondensortrieb nach oben drehen, bis das Bild der Leuchtfeldblende scharf ist, dann mit den schrägstehenden Zentrierschraube dieses Abbild ins Zentrum rücken, Leuchtfeldblende bis zum Bildrand öffnen, Kondensorbende bis auf 1/3 schließen. Nun sollte man ein gleichmäßig aus-geleuchtetes, scharfes Bild sehen. Wenn nicht, unbedingt Hilfe holen.

8. Lösungen und Puffer

Microtubule-stabilising buffer (MSB)

50 mM PIPES (1,4-piperazine-die-ethanesulfonic acid) – Pufferionen, um den pH zu halten
2 mM $MgSO_4$ – Mg-Ionen stabilisieren die Mikrotubuli
2 mM EGTA (β -aminomethyl ether)-N,N,N',N'-tetraacetic acid) – fängt Ca-Ionen ab, die destabilisieren
0.1 (v/v) % Triton X-100 – Detergens, das die Membran für die Antikörper permeabilisiert
[pH 6,9] – Achtung: EGTA löst sich erst nicht. Der pH ist erst ganz sauer. Man muss mit KOH-Plätzchen oder 3N KOH erst mal den pH hochbringen. Ab pH 6 löst sich EGTA dann schlagartig auf.

Carnoy Fixierlösung

2/3 Ethanol, 1/3 Essigsäure, 0,5% (v/v) Triton

Hoechst 33258

2'-(4-hydroxyphenyl)-5-(4-methyl-1-piperazinyl)-2,5'-bi(1H-benzimidazole) trihydrochloride
Stammlösung 100 mg/ml, wird bereitgestellt.

Sicherheitshinweis: alle Kernfarbstoffe interkalieren in die DNS (auch in Ihre DNS!). Handschuhe!

PFA Fixierlösung

3.7 % (w/v) paraformaldehyde (PFA) in MSB, wird bereitgestellt – die Aldehydgruppen vernetzen Proteine an den Aminogruppen und stabilisieren dadurch die Struktur.

Phosphate buffered saline (PBS)

150 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 1,2 mM KH_2PO_4 , 6,5 mM Na_2HPO_4 [pH 7.2]

Verdauungslösung

1 % w/v Macerozyme (Yakuruto), 0.2 % w/v Pectolyase (Serva) in MSB – verdauen Cellulose (Macerozym) und Pectine (Pectolyase) damit die Zellmembran zugänglicher wird. Wird frisch hergestellt.

Blocker

0.5 % (w/v) Bovine Serum Albumin (BSA) in PBS – blockt unspezifische Bindungen ab. Wird frisch hergestellt.

Antikörper

Primär: Monoklonaler anti alpha Tubulin (DM1A) aus Maus 1:500 in PBS – wird frisch verdünnt.
Sekundär: Polyklonaler anti mouse IgG, FITC Konjugat 1:250 in PBS – wird frisch verdünnt.

Rechenblatt

auch für die Lösungen, die wir Ihnen zur Verfügung stellen – es geht darum, dass Sie Geläufigkeit im Laborrechnen erwerben

Microtubule-stabilising buffer (MSB) - ansetzen

Volumen für 2 Zweierteams: 100 ml

50 mM PIPES

MW _____ 50 mM, 1 l: _____ g 50 mM, 100 ml: _____ g

2 mM MgSO₄

Achtung: Stammlösung machen (200 mM, 1 ml), dann 100 mal verdünnen

Stammlösung

MW _____ 200 mM, 1 l: _____ g 200 mM, 1 ml: _____ g

2 mM EGTA (β -aminomethyl ether)-N,N,N',N'-tetraacetic acid)

MW _____ 2 mM, 1 l: _____ g 2 mM, 100 ml: _____ g

0.2 % (v/v) Triton X-100

Achtung: „1 %“ v/v bedeutet 1/100 des Volumens, also auf 100 ml wäre das 1 ml Triton
0.2 %, 100 ml: _____ μ l

Carnoy Fixierlösung – nur berechnen, wird bereitgestellt

Volumen für den Kurstag: 50 ml

2/3 Ethanol auf 50 ml: _____ ml

1/3 Essigsäure , auf 50 ml: _____ ml

0,5% (v/v) Triton 0.5 % auf 50 ml: _____ ml

PFA Fixierlösung – nur berechnen, wird bereitgestellt

Volumen für den Kurstag: 50 ml

3.7 % (w/v) paraformaldehyde (PFA)

Achtung: „1 %“ w/v bedeutet 1/100 des Gewichts, also auf 100 ml wäre das 1 g PFA
3.7 %, 50 ml: _____ g

Phosphate buffered saline (PBS) - ansetzen

Volumen für 2 Zweierteams: 100 ml

150 mM NaCl

MW _____ 150 mM, 1 l: _____ g 150 mM, 100 ml: _____ g

2.7 mM KCl

MW _____ 2.7 mM, 1 l: _____ g 2.7 mM, 100 ml: _____ g

1.2 mM KH₂PO₄

MW _____ 1.2 mM, 1 l: _____ g 1.2 mM, 100 ml: _____ g

6.5 mM Na₂HPO₄

MW _____ 6.5 mM, 1 l: _____ g 6.5 mM, 100 ml: _____ g

Verdauulösung, wird frisch hergestellt

Volumen je Team: 500 μ l

1 % w/v Macerozyme

1 %, 1 ml: _____ mg

1 %, 500 μ l: _____ mg

0.2 % w/v Pectolyase

0.2 %, 1 ml: _____ mg

0.2 %, 500 μ l: _____ mg

Blocker, wird frisch hergestellt

Volumen je Team: 500 μ l

0.5 % w/v BSA

0.5 %, 1 ml: _____ mg

0.5 %, 500 μ l: _____ mg

Antikörper, wird frisch verdünnt

Volumen je Team: 500 μ l

Primär: Monoklonaler anti alpha Tubulin (DM1A) aus Maus 1:500 in PBS: _____ μ l

Sekundär: Polyklonaler anti mouse IgG, FITC Konjugat 1:250 in PBS: _____ μ l

9. Versuchsanweisung

Sterile Entnahme der Zellen

Benötigt

Pipetten, Tabakzelllinien BY2-WT (werden zur Verfügung gestellt) Bunsenbrenner, Laminar- Flow Sterilbank, Eppendorf-Reaktionsgefäße, worin 1 ml Fixans vorgelegt ist

Durchführung

Alle Arbeiten werden unter absolut sterilen Bedingungen an einer Sterilbank die ausschliesslich für pflanzliche Zellkulturen verwendet wird durchgeführt. Zunächst werden die Bank sowie alle benötigten Geräte mit 70% EtOH desinfiziert. Nun werden nach gründlichem Abflammen des Flaschenhalses in der die Tabakzellen kultiviert werden, ca. 300 µL Zellsuspension entnommen, in das Fixans überführt und durch mehrmaliges Kippen gemischt. Der Zeitpunkt wird notiert (Zeitpunkt 0 für die Fixierung). PFA reizt die Augen und Schleimhäute, daher sollte man das Gefäß nur öffnen, wenn es nötig ist.

Steriles Arbeiten mit pflanzlichen Zellkulturen:

Pflanzliche Zellkulturen sind sehr empfindlich gegen Befall mit Pilzen (Hefen) oder Bakterien. Darum muss hier steril gearbeitet werden. Durch Kontamination werden oft innerhalb von Tagen die Ergebnisse von Jahren Arbeit zerstört. Grundwerkzeug sind sogenannte *Laminar-Flow-Sterilbänke*: Durch einen Filter werden alle Keime herausgefiltert und die sterile Luft wird von der Rückseite der Arbeitsfläche her nach vorne, wo die experimentierende Person sitzt, geblasen. Beim sterilen Arbeiten ist wichtig, dass man sich jeden Schritt vorher überlegt - z.B. sollte man vermeiden, dass unsterile Gegenstände hinter den steril zu haltenden Zellen stehen (weil dann die Keime direkt in die Zellen geblasen würden), man sollte natürlich auch nicht mit unsterilen Gegenständen die Zellen berühren, etc. Dies ist mühevoll aber notwendig –die Herstellung von Zell-Linien dauert oft mehr als ein Jahr. Wenn man mit Flüssigkulturen arbeitet, immer die Flaschenhalse gut abflammen – dort sitzen die Keime. **Bitte schauen Sie sich vor dem Versuch das Demonstrationsvideo an – das spart allen viel Zeit!**

Mikrotubulifärbung

Prinzip

Die Zellen werden in einem speziellen Färbesieb (abgeschnittenes Eppendorf Reaktionsgefäß mit Nylonnetz, Maschenweite 70 µm) behandelt. Damit werden die Waschschrte vereinfacht und gleichzeitig der Verlust von Zellen verhindert.

Durchführung Immunfluoreszenzfärbung

- Die Zellen (ca. 250 µl) werden in das Färbesieb überführt und für 30 min bei Raumtemperatur fixiert (1 ml Fixativ).
- Die Zellen werden 3 x 5 min mit MSB (je 500µl) gewaschen und anschliessend für 5 min mit der Verdaulösung (500 µl) verdaut.
- Erneut 3 x 5 min mit MSB waschen und 20 min blocken (500 µl).
- Über Nacht bei 4 °C mit primärem Antikörper in einer feuchten Kammer inkubieren.
- 3 x 5 min mit PBS waschen.
- Inkubation mit sekundärem Antikörper für 45 min bei 37 °C, anschließend 3 x 5 min in PBS (500 µl) waschen.
- Auswertung der Färbung am Mikroskop.

Durchführung Mitoseindex

- Sterile Entnahme von jeweils ca. 300 µl Zellsuspension in vorgelegtes Fixans
- Fixierung der Zellen mit Carnoy Fixierlösung für ca. 10 min bis die Zellen sedimentiert sind, danach den Überstand verwerfen.
- Überführung der Zellen in Färbesiebe, 2 x 5 min mit PBS waschen.
- Färbung mit 2 µl Hoechst 33258 Stammlösung in 500 µl PBS für 5 min.
- Zur Auswertung und Bestimmung des MI werden je Probe ca. 500 Zellen ausgezählt und die Anteil der sich teilenden Zellen bestimmt.

Toxikologie und Entsorgung

Paraformaldehyd (PFA) ist reizend. Das Herstellen der Fixierlösung sollte unter dem Abzug durchgeführt werden. Handschuhe und Schutzbrille tragen da PFA Haut und Augen ätzen kann.

Höchst (wie alle anderen Kernfarbstoffe auch) interkaliert in die DNS, auch in ihre DNS. Daher beim Hantieren mit Höchst Handschuhe tragen.

Entsorgung:

PFA wird mit 1 % Natriumbisulfit (1:1) versetzt. Dies führt zur Reduktion von PFA zu Methanol, was nun im Abfluss entsorgt werden kann.

Objektträger mit Höchst: werden nicht wiederverwertet, sondern in den aufgestellten Plastikflaschen gesammelt.

Alle anderen Reagentien sind unproblematisch und können über den Abguß entsorgt werden.

9. Referenzen

IF-Protokoll Mikrotubuli in Tabak BY-2:

Nick P, Heuing A, Ehmann B (2000) Plant chaperonins: a role in microtubule dependent wall-formation? Protoplasma 211, 234-244

Review über pflanzliche Mikrotubuli (kann man auf meiner Internetseite unter meistzitierte Arbeiten herunterladen)

Nick, P. (1999) Signals, Motors, Morphogenesis - the Cytoskeleton in Plant Development. Plant Biol. 1, 169-179

Review Immunfluoreszenz und Erforschung des Cytoskeletts

Lloyd CW (1987) The plant cytoskeleton: the impact of fluorescence microscopy. Annu Rev Plant Physiol 38, 119-139

Review Rolle des Einsatzes von Konfokalmikroskopie für die zellbiologische Forschung

Hepler PK, Gunning BES (1998) Confocal fluorescence microscopy of plant cells. Protoplasma 201, 121-157