

Mikromanipulation an pflanzlichen Zellen im Biologieunterricht mittels der Mikroinjektionstechnik

Gordon Dzemski¹

Kurzfassung

Für die Schulpraxis wird ein biotechnologisches Verfahren beschrieben, mit dem Schüler selbständig Mikromanipulationen an pflanzlichen Zellen durchführen können. Glasmikropipetten werden durch die Pull-Down-Methode selbständig hergestellt. Diese Mikropipetten werden durch ein zum Mikromanipulator unfunktioniertes Mikroskop gehalten und im Raum fixiert. So werden aus Wasserpestzellen Chloroplasten extrahiert und, beispielhaft als Klonexperiment, in Zwiebelzellen eingepflanzt. Es stellt sich heraus, dass ohne großen technischen Aufwand Mikromanipulationsexperimente in der Schule möglich sind.

Keywords

Mikromanipulation, Mikroinjektion, Plastidenextraktion, Biotechnologie, Schulexperimente

1 Einführung

Ein wichtiger Bereich der modernen Biotechnik ist die Manipulation von Zellen. Für das Klonen von Tieren (z.B. Hochleistungs-Milchkühe, Labormäuse) werden Kerne aus Zellen entnommen und in andere, vorbereitete Zellen eingesetzt. Auch für die Form der In-Vitro-Insemination sind solche Manipulationen von Zellen mit Mikropipetten notwendig. Mikroinjektionen nutzt man gleichfalls, um rekombinierte DNS in einen Nukleus, den Zellkern, zu injizieren.

Die dafür in der Labortechnik verwendeten Mikromanipulatoren sind zu aufwändige, teure Präzisionsgeräte, die für den Einsatz im Schulunterricht nicht in Frage kommen. Im Folgenden soll dargestellt werden, dass es einfache Möglichkeiten gibt, um solche Experimente der Zellmanipulation auch im Unterricht praktisch zu erproben und damit erfahrbar zu machen. Glasmikropipetten, Geräte zur Herstellung dieser Pipetten (Puller) und Mikromanipulatoren können mit normaler Laborausrüstung hergestellt und im Unterricht eingesetzt werden.

¹ Eingereicht am 6.6.2004, überarbeitet zum 1.8.2004, angenommen am 3.8.2004

Ziel ist es, dem Schüler die Möglichkeit zu geben, ein anspruchsvolles Experiment mit biotechnologischem Bezug durchzuführen, um die Verfahrenstechniken zu verstehen, die im Hintergrund von Klonierungsversuchen stehen.

Dabei steht nicht die Ausbildung von Manuellen Fertigkeiten im Vordergrund, sondern das Erleben der Mikromanipulation im eigentlichen Sinne: Das Manipulieren von Zellorganellen mittels selbst hergestellten Werkzeugen in einer pflanzlichen Zelle. Somit kann zusätzlich zum biotechnologischen Verfahren der Klonierung dem Schüler ein lebendiger Eindruck des Zellaufbaus vermittelt werden, der weit über das Erlebnisniveau von Zeichnungen, Bildern oder Plastikmodellen hinausgeht.

Außer der Anleitung zu Herstellung und Einsatz dieser Geräte werden weitere Ziele diskutiert, die damit im Unterricht erreicht werden können.

2 Herstellung und Anwendung der Geräte

2.1 Die Mikropipette

Die Mikropipette ist das Hauptwerkzeug der Mikromanipulation. Von ihrer in der Herstellung erreichten Qualität wird der Erfolg oder Misserfolg der Experimente zum großen Teil mitbestimmt. Es ist bei der Herstellung der Mikropipetten auf äußerste Sorgfalt zu achten.

Zur Herstellung der Mikropipetten sind folgenden Materialien notwendig:

◦ Pasteurpipette (15 cm lang)	◦ Krokodilklemme (ohne Plastik)
◦ Flammenregulierbares Feuerzeug	◦ 1 kleines Becherglas (100 ml)
◦ Schere	◦ 1 mittleres Becherglas (400 ml)
◦ Skalpell	◦ 1 großes Becherglas (1000 ml)
◦ Gerätehalter (aus Metall)	◦ Zellstoff (z.B. Taschentücher)
◦ Reagenzglashalter (ohne Kork)	◦ Arbeitskittel
◦ Verschließbarer Sammelbehälter	◦ Schutzbrille
◦ Mikroskop	◦ Wasser und Pipette
◦ Okularmikrometer (mit Eichskala)	◦ Destilliertes Wasser

Schritt 1: Voraussetzungen zur Herstellung der Mikropipetten

Es ist von äußerster Wichtigkeit, die Mikropipetten an einem sauberen und ruhigen Ort anzufertigen. Dieser Ort (zweckdienlich ein Labor) sollte einen Tisch (mit feuerfester Unterlage) und einen Stuhl aufweisen. Es muss darauf geachtet werden, dass sich keine starke Luftströmung im Raum befindet und der Tisch nicht durch Vibration erschüttert wird (z.B. LKW's oder eine U-Bahn in der Nähe, laufende Menschen im Raum).

Schritt 2: Herstellung der Mikropipetten (Pull-Down-Methode)

1. Der Reagenzglashalter wird an dem Gerätehalter auf 40 cm Höhe befestigt. Der Aufbau steht auf einer feuerfesten Unterlage.

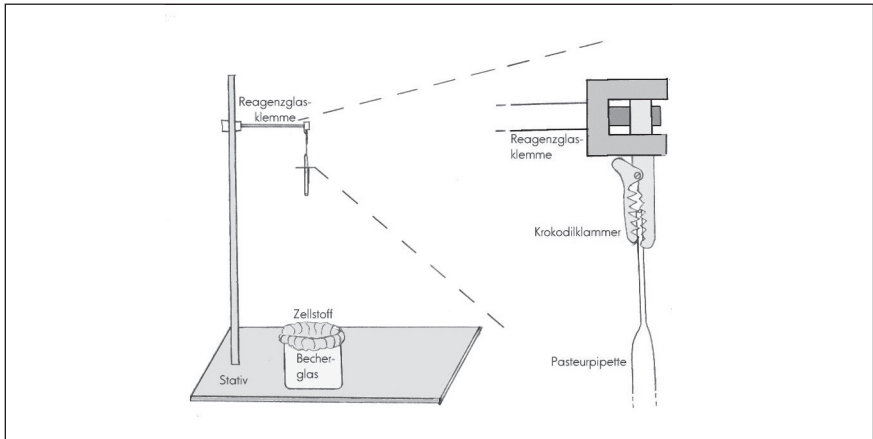


Abb. 1: Aufbau des Pullers. In der Vergrößerung die Aufhängevorrichtung der Pasteurpipette

2. Mit dem Reagenzglashalter wird die Krokodilklemme eingespannt, die später die Pipette hält.
3. Das Zellstofftuch wird in das mittlere Becherglas (400 ml) gelegt, sodass eine aus 20 cm herunterfallende Pipette, ohne das Glas zu berühren, in den Becher hineinfallen kann. Das auf diese Weise vorbereitete Becherglas wird unter die Krokodilklemme auf den Tisch gestellt.
4. Die Pasteurpipette wird mit der Spitze vorsichtig in die Krokodilklemme eingespannt. Sie muss möglichst senkrecht nach unten hängen.
5. Bei der Herstellung der Mikropipette sollte der Arm, mit dem das Feuerzeug gehalten wird, mit dem Ellenbogen auf dem Tisch gestützt sein. Dies ermöglicht ein genaues Arbeiten. Das Feuerzeug wird auf kleinste Flamme eingestellt. Zuerst wird die Spitze der Pasteurpipette erhitzt, indem die Feuerzeugflamme das Glas vollkommen umgibt. Es sollte ungefähr ein bis zwei Zentimeter unter der Krokodilklemme angesetzt werden.
6. Nach ca. 15 Sekunden bewegt sich die Pipette im Ganzen etwas nach unten, da das durch die Hitze weich gewordene Glasröhrchen dem Rest der Pipette keinen Widerstand mehr bietet und sich die ganze Pipette nun lotrecht ausrichtet. Genau bei diesem Anschmelzen der Pipette wird das Feuerzeug von der Pipette weggezogen!
7. Die Feuerzeugflamme wird jetzt stoßweise an das Glasröhrchen geführt, bis die erhitzte Stelle durch das Eigengewicht des Pipettenkörpers immer weiter nach unten gezogen wird und sich verjüngt. Je dünner die Pipette an der erhitzten Stelle wird und je kürzer dieser Bereich ist, desto stabilere Mikropipetten entstehen.

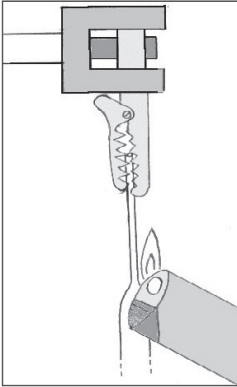


Abb. 2: Stellung des Feuerzeugs zur Pipette

8. Die Flamme des Feuerzeugs braucht, je schmäler das Glasröhrchen wird, die Pipettenspitze nicht mehr einzuwickeln. Das Schmelzen beginnt schon bei geringer Entfernung (ca. 5 mm) der Flamme. Das Feuerzeug muss immer etwas in Richtung Pipettenkörper nachgeführt werden, damit das feine Glasröhrchen (Kapillare) nicht durchschmilzt.
9. Ist der Durchmesser der Kapillare, welches die Pasteurpipette mit dem oberen Spitzenteil verbindet auf den Durchmesser eines Haares gestreckt, kann das Feuerzeug mit der blauen Flamme in die Nähe des dicksten Teils der Spitze der Pasteurpipette angesetzt werden, sodass das feine Glasröhrchen durchschmilzt. Die Mikropipette fällt in das vorbereitete Becherglas und wird dort weich vom Zellstofftuch aufgefangen. Es muss darauf geachtet werden, dass mit so geringer Hitze wie möglich gearbeitet wird. Je weniger Hitze eingesetzt wird (kleine Flamme, größere Entfernung zur Pipette), desto feiner wird die Spitze der Mikropipette.

Die Roh-Mikropipette ist nun fertig. Sie ist mit einem durchschnittlichen Spitzendurchmesser von 1 – 10 μm zu dünn. Deswegen muss die Roh-Mikropipette in einem weiteren Arbeitsgang zurechtgeschnitten werden.

Schritt 3 – Zurechtschneiden der Roh-Mikropipette

Hierzu wird ein Mikroskop aufgebaut und das Okularmikrometer mit einem Objektmikrometer geeicht. Ist dies geschehen, wird ein normaler Objektträger auf dem Objektisch des Mikroskops eingespannt und ein Tropfen destilliertes Wasser aufgetragen. Das Skalpell und die Roh-Mikropipette werden griffbereit abgelegt.

Bei 100facher Vergrößerung wird der Spitzendurchmesser der Roh-Mikropipette bestimmt. Die Pipette wird mit der linken Hand (für Rechtshänder) in das Sichtfeld geschoben und mittels des geeichten Okularmikrometers abgelesen.

Die rechte Hand bedient das Skalpell, mit der dieses unter das Objektiv des Mikroskops geführt wird. Dort ist das Skalpell als schwarzer Schattenriss deutlich zu erkennen.

Die Roh-Mikropipette wird nun auf einen Durchmesser von $\sim 15 \mu\text{m}$ in das Sichtfeld gebracht. Gleichzeitig liegt die Skalpellklinge über der Roh-Mikropipette im Sichtfeld des Betrachters. Durch einen kurzen Druck mit dem Skalpell auf das Glasröhrchen der Roh-Mikropipette kurz vor dem anvisierten Schnittpunkt der Pipette bricht sie an der gewollten Stelle durch. Es ist wichtig, etwas vor der Soll-Bruchstelle, im dünneren Bereich der Roh-Mikropipette, den Schnittpunkt

anzusetzen. Die Ist-Bruchstelle liegt in der Regel etwas mehr im dickeren Bereich, da sich die feine Glasröhre etwas biegt und eher an der Biegung auseinander bricht anstatt an dem eigentlichen Druckpunkt des Skalpell. Die abgebrochene Glaskapillare soll sich im Wassertropfen befinden, damit diese nicht verloren geht und angemessen entsorgt werden kann. Die fertige Mikropipette wird nun in ein weiteres mit Zellstoff ausgelegtes kleines Becherglas (100 ml) gelegt und zum Schutz vor Verletzungen der Experimentatoren und der feinen Spitzen mit einem großen Becherglas (1000 ml) abgedeckt.

Es bedarf etwas Übung, Mikropipetten herzustellen. Nach einigen Versuchen wird es aber jedem ohne Schwierigkeiten gelingen

2.2 Aufbau des Mikromanipulators

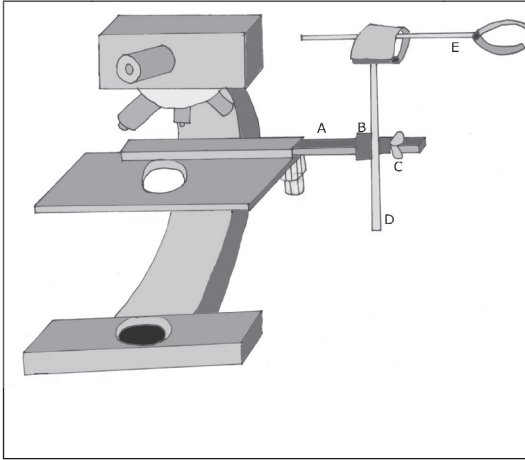
Um eine Mikromanipulation an Zellen erfolgreich durchzuführen, reicht die Bewegungsgenauigkeit der menschlichen Hand nicht aus. Ein Mikromanipulator hilft hierbei, die genaue Positionierung auf $<1 \mu\text{m}$ im dreidimensionalen Raum durchzuführen.

Die hier vorgeschlagene Alternative nutzt ein Mikroskop mit Kreuztisch, wie es in den meisten Schullaboratorien zu finden ist.

Materialien für den Bau eines Mikromanipulators:

<ul style="list-style-type: none"> < Mikroskop mit Objektträgerführung auf der x- und y-Achse (z.B. Olympus) < 2 Reagenzglasklammern aus Metall < 1 Reagenzglasklammerhalter aus Metall < Taschentuch 	<p>Für die nachfolgenden Schritte (Kap. 1.3/1.4) wird benötigt:</p> <ul style="list-style-type: none"> < Skalpell < Objektträger und Deckglas < Wasserpest und Zwiebeln < Kolbenprober (100 ml) < Kautschukschlauch ca. 50 cm, Innendurchmesser 5 mm
---	--

1. Die gezahnte Führungsstange (A) der Objektträgerführung wird aus der Mechanik gefahren, indem die Kontrollräder unter dem Objektisch benutzt werden. An dieser Führungsstange wird ein Taschentuch (B) befestigt, um die Zähne der Stange zu schützen.
2. An der mit dem Taschentuch befestigten Führungsstange wird ein Reagenzglasklammerhalter (C) mit seiner Flügelschraube verschraubt.
3. An dieser Verankerung wird senkrecht eine Reagenzglasklammer (D) befestigt.



4. Eine zweite Reagenzglaslammer (E) wird waagrecht befestigt, um später die Mikropipetten zu fixieren.

So aufgebaut, ist der Mikromanipulator in der Lage, jeden gewünschten Punkt im dreidimensionalen Raum anzusteuern und dort erschütterungsfrei zu verweilen.

Abb. 3: Aufbauschema des Mikromanipulators

2.3 Vorbereitung des Zellmaterials

Für die Chloroplastentransplantation werden die Plastiden aus Wasserpestzellen extrahiert und in Zwiebelepidermiszellen implantiert.

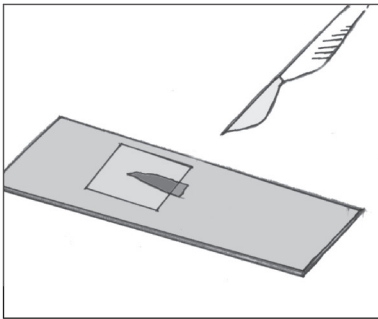


Abb. 4: Lage des Wasserpestblattes bzw. der Zwiebelschuppenepidermis zum Deckglas

Wasserpestzellen

Ein Wasserpestblatt wird von der Pflanze abgenommen, mit der Unterseite (konkave Seite) auf einen Objektträger gelegt. Auf der Oberseite des Blattes befinden sich die größeren Zellen. Das Wasserpestblatt sollte möglichst groß und die Zellen sollten unter dem Mikroskop gut zu erkennen sein.

Ein großes Deckglas wird auf das aufgeschnittene Wasserpestblatt gelegt. Mit einem Skalpell soll ein möglichst gerader Querschnitt die Wasserpestzellen an der Längskante aufschneiden, sodass sie später ideal mit der Mikropipette manipulierbar sind.

Die Schnittkante ragt aber unter dem Deckglasrand hervor. So soll verhindert werden, dass die Spitze der Mikropipette das Blatt unter das Deckglas schiebt, wenn in die Zellen eingedrungen wird.

Durch einen Wassertropfen, der unter dem Deckglas mit einem Zelltuch durchgezogen wird, haftet die Abdeckung durch die Adhäsion des Wassers an dem Glas und die Kohäsion der Wassermoleküle untereinander stark am Objektträger. Das

Wasserpestblatt kann nicht mehr verschoben werden. Ein kleiner Wassertropfen soll auf die Schnittkante und dem davor liegenden Objektträger geträufelt werden. Es ist darauf zu achten, dass kein Wasserfilm den Wassertropfen unter das Deckglas zieht, dieses dann auf einem Wasserfilm schwimmt und nicht mehr die Haltekräfte auf das Wasserpestblatt ausüben kann.

Zwiebeln

Die Zwiebel wird geschält und geviertelt. Einige Schuppenblätter werden aus dem Inneren der Zwiebel herauspräpariert.

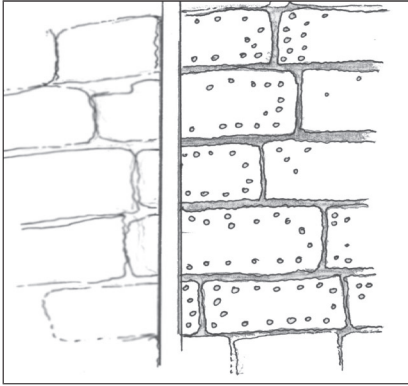


Abb. 5: Mikroskopische Ansicht der Schnittkante (rechts) der Wasserpestzellen. Deckglasrand (Mitte)

Von der konkaven Seite eines Schuppenblattes wird ein ca. 1 cm x 2 cm großes Epidermisstück mit dem Skalpell ausgeschnitten und mit einer feinen Pinzette abgenommen.

Dieses Präparat wird auf einen Objektträger gelegt und mit etwas Wasser beträufelt. Unter dem Mikroskop kann die Ausrichtung der Zellen festgestellt werden. Quer zu der Ausrichtung soll die Schnittkante verlaufen. Diese wird mit einem Skalpell gezogen. Nur ein Stück der Epidermis verbleibt auf dem Objektträger. Die Schnittkante wird quer zur Längsrichtung des Objektträgers ausgerichtet, damit die Mikropipette später

Zugang zu den offenen Zellen hat. Ein großes Deckglas soll das Präparat fixieren. Ein Wassertropfen schützt die Schnittkante der Zwiebelzellen vor dem Austrocknen. Es ist darauf zu achten, dass dieser Wassertropfen nicht durch einen Wasserfilm unter das Deckglas gesogen wird. Die Arbeitsschritte sind der Vorbereitung der Wasserpestzellen sehr ähnlich.

2.4 Durchführung der Chloroplastentransplantation

Schritt 1 – Vorbereitung des Arbeitsplatzes

Der Arbeitsplatz sollte gut beleuchtet, sauber und ruhig sein. Es dürfen keine Vibrationen den Versuchsaufbau stören. Ein schwerer fester Tisch ist unerlässlich. Schutzkleidung wie Kittel und Schutzbrille sind, wie bei jedem Experiment, auch hier anzulegen. Mikroskop, Mikromanipulator, Mikropipette, Kolbenprober, Kautschukschlauch und das pflanzliche Präparat liegen auf dem Experimentiertisch.

Das vorbereitete Wasserpestblatt (siehe vorangegangene Beschreibung) wird bei 100facher Vergrößerung (Objektiv 10x und Okular 10x) unter das Mikroskop gelegt.

Schritt 2 – Fokussierung der Wasserpestschnittkante

Im Sichtfeld des Okulars sollen die Zellen vertikal durch das Sichtfeld verlaufen (siehe Abb. 5). Bei der Injektion ist dies von größter Wichtigkeit, da später nur schwer Winkelkorrekturen am Präparat vorgenommen werden können.

Schritt 3 – Konfiguration des Mikromanipulators

Der Mikromanipulator soll auf seine Mittelstellung gefahren werden. Dazu werden die x- und y-Achse der Objektträgerführung (von oben auf das Mikroskop gesehen) auf einen Spielraum von 3 cm in jede Richtung eingestellt. Die z-Achse des Manipulators wird ganz nach oben gefahren (mittels des Fokussierungsgetriebes des zum Mikromanipulator umgebauten Mikroskops).

Eine vorbereitete Mikropipette ($\sim 15 \mu\text{m}$ Spitzendurchmesser) wird in den Reagenzglashalter eingespannt und fest arretiert. Die Mikropipette wird mit einer max. Neigung von 10° spitzendwärts festgezogen. Der mechanische Aufbau des Manipulators soll sich nur minimal bewegen können. Ein fester Sitz der Elemente ist für die Extraktion sehr wichtig.

An das hintere Ende der Mikropipette wird ein Kautschukschlauch angeschlossen. Dieser soll ca. 50 cm lang sein und an einen Kolbenprober münden. Dieser ist für den Druck bzw. Unterdruck in der Mikropipette zuständig.

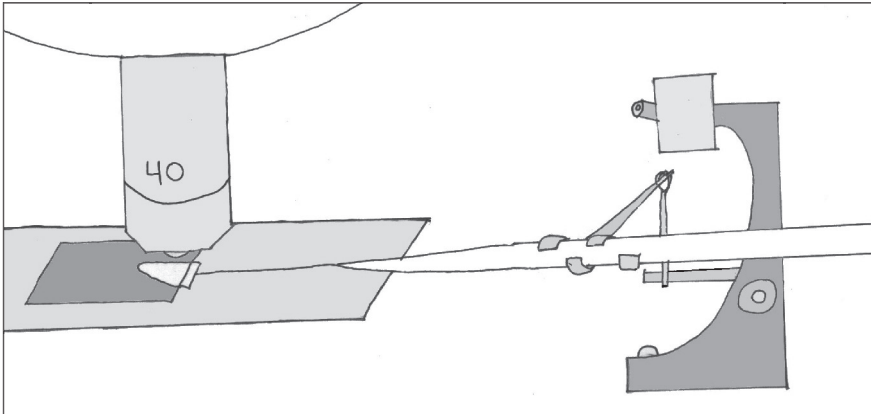


Abb. 6: Geräteaufbau (Schema)- Mikroskop (links) und Mikromanipulator mit eingespannter Mikropipette (rechts)

Schritt 4 – Konfiguration des Mikromanipulators zum Mikroskop

Der Mikromanipulator wird neben das Mikroskop mit der Probe gestellt. Die Spitze der Mikropipette soll sich 1 cm vor dem Objektiv und 1 cm über dem Objektisch befinden, erst dann werden die Justierräder des Mikromanipulators benutzt. Starke Erschütterungen sind hierbei zu vermeiden, da die Spitze der Mikropipette durch die Vibrationen leicht abbricht.

Schritt 5 – Feinjustierung der Mikropipette

Mit der z-Achsenregulation des Mikromanipulators wird die Mikropipette bis auf 1 mm über das Deckglas gefahren. Eine starke Beleuchtung von oben und der Seite ist bei dieser Phase sehr wichtig. Besonders geeignet sind hierfür Glasfaserlampen, die durch die flexiblen Lichtleiter sehr angenehm zu justieren sind. Eine Schreibtischlampe erfüllt zur Not gleichfalls diesen Zweck.

Befindet sich die Mikropipette ca. 1 mm über dem Objektträger, wird mit der x-Achsenregulation die Pipette in Richtung Wasserpestblatt gefahren. 1 mm vor der Berührung mit dem Präparat schwebt die Pipette in der Luft bzw. ist schon in den Wassertropfen vor der Schnittkante des Wasserpestblattes eingedrungen.

Schritt 6 – Mikrojustierung der Mikropipette

Der Blick in das Okular des Mikroskops zeigt die aufgeschnittenen Zellen der Wasserpest. In der überwiegenden Zahl der Versuche ist die Mikropipette jetzt noch nicht zu sehen. Sie befindet sich häufig noch außerhalb des Sichtfeldes und muss nun durch die Feinjustierung der x- und y-Achse in dasselbe gefahren werden. Die Mikropipette kann zuerst als verschwommener Bereich gesehen werden und wird nach der Lokalisation langsam in dieselbe Schärfenebene wie die Wasserpestzellen gefahren. Ist die Spitze vollkommen in derselben Tiefenebene wie das Präparat, wird sie in einem Abstand von ungefähr 200 μm bis 300 μm vor den Wasserpestzellen gehalten.

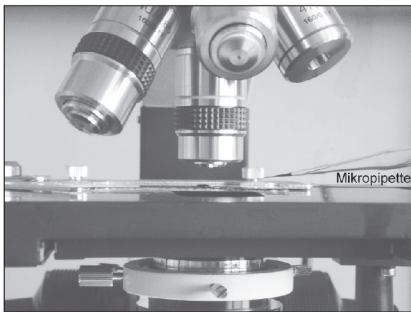


Abb. 7: Mikropipette (rechts) in Ausrichtung zum Mikroskop

Schritt 7 – Wechseln der Vergrößerung

Die Vergrößerung des Objektivs wird nun von 10fach auf 40fach umgestellt, indem der Objektrevolver gedreht wird.

Die Gesamtvergrößerung des Mikroskops soll sich auf 400fach belaufen (10x40). Hierbei ist zu beachten, dass keine Berührung zwischen Objektiv und Mikropipette stattfindet. Wenn der maximale Winkel der Mikropipettenjustierung von 10° eingehalten wurde, ist es keine Schwierigkeit die Objektive zu wechseln. Das Objektiv schwenkt über die Pipette hinweg.

Schritt 8 – Einführen der Mikropipette in die Führungszelle

Eine aufgeschnittene, große Wasserpestzelle wird anvisiert. Der Durchmesser der Zellöffnung sollte mindestens 20 μm größer sein als die Pipette. Ein geringerer Querschnitt würde bei der Penetration der Zelle das Präparat zu sehr zerstören und die Organellenextraktion könnte nicht durchgeführt werden.

Durch die x-Achsenregulierung des Mikromanipulators wird die Mikropipette zur Führungszelle gefahren. 5 μm vor der Zelle ist die Fokusebene genauestens

einzustellen. Nur bei gleicher Fokussierung sind die Objekte auf der gleichen Ebene und die Pipette kann in die Führungszelle einfahren. Nun wird die Mikropipette vorsichtig in das Innere der Führungszelle gebracht. Ob sich die Spitze der Mikropipette wirklich in der Zelle befindet und nicht etwa unter oder über den Zellen, kann durch das Bewegen der Spitze auf der y-Achse überprüft werden. Biegt sich die Spitze etwas durch den Widerstand, den die Zellwände ihr entgegenbringen, ist es sicher, dass die Mikropipette sich in der Führungszelle befindet.

Schritt 9 – Penetration einer intakten Wasserpestzelle

Durch den flachen Winkel der Mikropipette kann diese leicht durch die Führungszelle an die hintere Zellwand der aufgeschnittenen Wasserpestzelle gefahren werden. Die obere Zellwand wird dadurch nicht angehoben. Auch deshalb ist es wichtig, den Winkel der Mikropipette unter 10° zu belassen. Die Spitze der Mikropipette soll an die gegenüberliegende Wand stoßen. Die Führungszelle übernimmt eine stabilisierende Funktion. Die Spitze der Mikropipette kann bei der Penetration nicht so leicht aus der Richtung abweichen und verbiegen. Die Kraft wird konzentrierter an die Spitze der Pipette geleitet. Durch weiteres Drehen an der x-Achsenregulierung des Mikromanipulators wird die punktuelle Kraft auf die Zellwand erhöht. Die Zelle zerreißt an dieser Stelle und die Mikropipette fährt in die intakte Zelle ein. Sofort ist das Stoppen der Cytosolzirkulation zu erkennen.

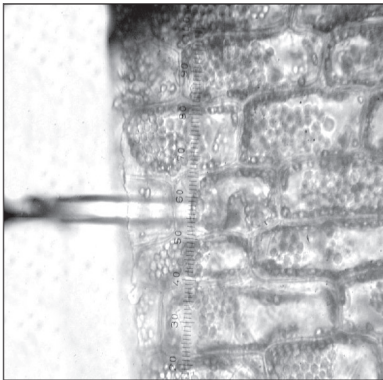


Abb. 8: Mikropipette sticht in eine intakte Wasserpestzelle ein

Schritt 10 – Extraktion eines Chloroplast aus der Wasserpestzelle

Durch leichtes Ziehen an dem Kolben des Kolbenprobers wird ein Unterdruck in der Mikropipette erzeugt und Organellen werden aus der Zelle gesogen. Je nachdem wie stark gesogen wird, desto mehr wird aus den Zellen extrahiert.

Nach abgeschlossener Extraktion sind die Organellen in der Mikropipette. Der Unterdruck darf bei dem Ausfahren aus der Zelle nicht abgelassen werden, da sonst eine Sogwirkung zurück in die Zelle auf die Mikropipette wirkt und somit den vollständigen Pipetteninhalt wieder in die Zelle verliert. Die Mikropipette wird aus der Führungszelle entfernt und je nach Bedarf ganz aus dem Sichtbereich zurück in die makroskopische Umgebung gefahren oder für eine Organellentransplantation unter dem Mikroskop belassen.

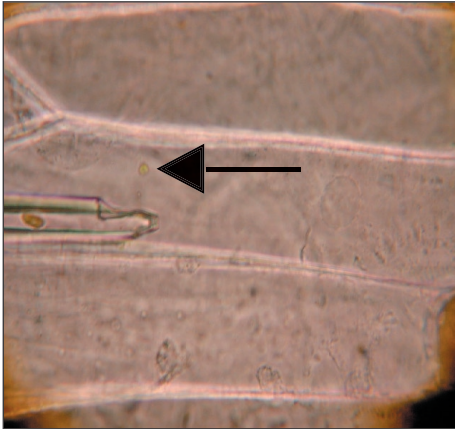


Abb. 9: Zwiebelzelle mit implantiertem Chloroplast (siehe Pfeil)

Schritt 11 – Organellentransplantation in die Zwiebelzelle

Der vorbereitete Objektträger mit der Zwiebelepidermis wird vorsichtig unter das Objektiv und der Mikropipette gelegt. Langsam wird die Zwiebelzellenschnittkante fokussiert und auf die gleiche Schärfenebene wie die Mikropipette gebracht. Die Mikropipette wird langsam in die Zwiebelzelle eingeführt.

Nach der Penetration der Zellwand um in die Zelle zu gelangen, wird unter leichtem Druck auf den Kolbenprober der Inhalt der Mikropipette in die Zwiebelzelle injiziert, bis sich ein Chloroplast in der Zelle befindet.

Die Mikropipette wird vorsichtig aus der Zelle gefahren und die Zwiebelzelle einige Minuten weiter beobachtet.

3 Ergebnisse

Herstellungsergebnisse von Mikropipetten

Durch die Entwicklung der Pull-Down-Methode ist es möglich, Glasröhrchen oder Pasteurpipetten relativ einfach zu Mikropipetten zu ziehen. Versuchsreihen zur Herstellung der Pipetten ergeben, dass die geforderten $15\ \mu\text{m}$ bis $25\ \mu\text{m}$ bei der Organellenextraktion häufig weit unterschritten werden. Oft liegt der Spitzendurchmesser der Mikropipetten unter $10\ \mu\text{m}$. Oft sogar unter $1\ \mu\text{m}$.

Für den experimentellen Gebrauch müssen alle feinen Rohmikropipetten auf das entsprechend geforderte von Maß von $15\ \mu\text{m}$ bis $20\ \mu\text{m}$ zurechtgeschnitten werden.

Diagramm 1 zeigt eine Versuchsreihe zur Herstellung von Mikropipetten nach der Pull-Down Methode und deren Spitzendurchmesser vor dem Zurechtschneiden der Glaskapillaren. Deutlich zu erkennen ist, dass Mikropipette Nr.1-15 zurechtgeschnitten werden müssen, Mikropipette Nr.16-18 gebrauchsfertig sind und Mikropipette Nr.19 und 20 unbrauchbar sind. Zu 90% gelingt ungeübten Schüler ab Klassenstufe 10 die Herstellung der Mikropipette für die mikromanipulatorischen Experimente.

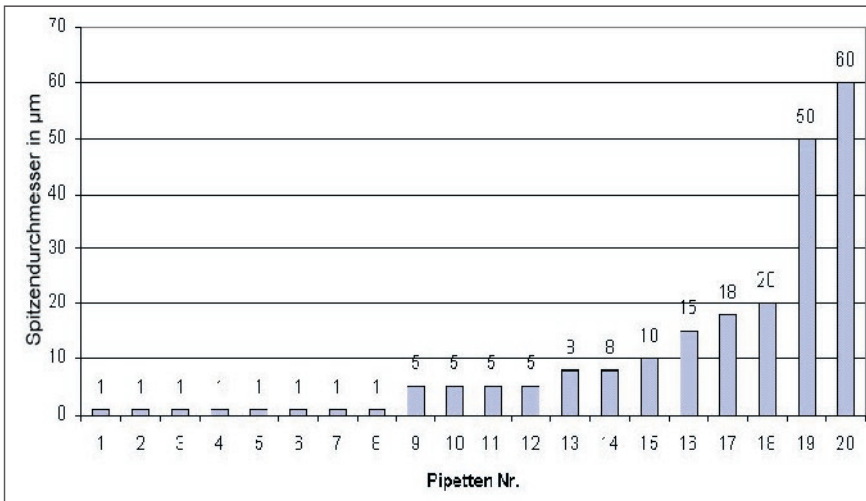


Diagramm 1: Spitzendurchmesser von Mikropipetten nach der Pull-Down Methode

Organellenextraktion und –transplantation

Mittels der hergestellten Mikropipetten ist es mit wenig Aufwand im Schullabor oder einem einfach eingerichteten naturwissenschaftlichen Labor möglich, Organellen (vorzugsweise Chloroplasten oder eingefärbte Zellkerne) aus Zellen zu extrahieren und modellhaft in „entkernte“ Zelle zu transplantieren.

Als Einstieg in die Mikromanipulation eignen sich Zellen aus Zwiebelepidermishäutchen gut. Sie sind leicht zu präparieren und, aufgrund ihrer Größe, einfach mit den selbst hergestellten Mikropipetten zu penetrieren. Erste „Gehversuche“ können in diesen Zellen durchgeführt werden, indem z.B. ein mit Methyl-Blau angefarbter Zellkern extrahiert und in eine benachbarte Zelle implantiert wird. Ist dieses Experiment gut verlaufen, kann zur beschriebenen Chloroplastenextraktion übergegangen werden.

Die mit den mikromanipulatorischen Instrumenten durchgeführten Versuche an Zellen haben folgende Ergebnisse erzielt:

- Ein modifiziertes Mikroskop kann als Mikromanipulator präzise Bewegungen in der x-, y- und z-Achse ausführen. Die erreichte Bewegungsgenauigkeit liegt bei $<1 \mu\text{m}$. Dies reicht für die Organellenextraktion von pflanzlichen Zellen vollkommen aus.
- Mikropipetten mit einem Spitzendurchmesser von $15 \mu\text{m}$ bis maximal $25 \mu\text{m}$ erzielten die besten Ergebnisse bei der Penetration der Zellen und der anschließenden Extraktion der Organellen. Mikropipetten mit einem Spitzendurchmesser von weniger als $15 \mu\text{m}$ sind sehr schwer in die Zelle

zu stoßen. Sie brechen häufig ab. Bei einem Spitzendurchmesser von mehr als $25\ \mu\text{m}$ ist die Zerstörung der penetrierten Zelle zu groß. Teile des Zellplasmas laufen aus und die Zelle ist somit nicht mehr als Versuch- und Modellobjekt zu gebrauchen.

- Um einen Unterdruck oder Überdruck in der Mikropipette zu erzeugen, lieferte ein Kolbenprober mit einem Volumen von 100 ml in Verbindung mit Mikropipetten (Spitzendurchmesser $15\text{-}25\ \mu\text{m}$) die besten Ergebnisse. Somit können Organellen in die Pipette eingesogen und wieder ausgestoßen werden.
- Chloroplasten können relativ einfach aus Wasserpestzellen extrahiert werden.

4 Diskussion

Die vorgestellte Methode der Organellentransplantation ist als ein Modell für das Klonen durch Zellkerntransplantation zu sehen. Die Zellen, aus denen die Organellen extrahiert werden, sterben (STECK 2001). Die Zelle, in der die Organelle implantiert wird, sollte in professionellen Laboratorien am Leben bleiben.

Durch die starre Zellwand der pflanzlichen Zellen kann nur eine relativ breite Mikropipette gestoßen werden. Das hat den Tod der Zelle zur Folge. Eine Möglichkeit, diesen Zelltod zu umgehen und damit lebensfähige Zellen zu produzieren, wäre das Herstellen von Protoplasten. Protoplasten sind Pflanzenzellen, denen die Zellwand enzymatisch entfernt wird (NEUMANN 1995).

Diese Form der Zellen kann leicht durch eine sehr dünne Mikropipette ($<1\ \mu\text{m}$) manipuliert werden, ohne dass sie dabei zerstört wird.

Auch in professionellen Laboratorien werden mit dieser Methode Organismen per Hand geklont. Ein geübter Manipulator braucht ca. 10 bis 15 Minuten, um eine Zelle zu entkernen und den vorbereiteten Zellkern in diese einzupflanzen (STECK 2001). In der Schule muss man für das Transplantieren von Chloroplasten aus Wasserpestzellen in Zwiebelzellen etwa 60 Minuten einplanen. Vorher müssen alle Gerätschaften, wie oben beschrieben, aufgebaut sein.

Schüler haben hier die Möglichkeit einen Einblick in ein biotechnologisches Verfahren zu bekommen, welches dem einzelnen Schüler immer häufiger begegnet. Sie werden immer wieder vor die Entscheidung gestellt, biotechnologisch erzeugte Produkte zu unterstützen oder abzulehnen. Durch das Verstehen der Mikromanipulation von Zellen können sie sich mit selbstdurchgeführten praktischen Experimenten einen Einblick in die Biotechnologie verschaffen, um ihr Urteilsvermögen zu schärfen und somit eine angemessene Beurteilung verschiedener Sachverhalte im Biotechnologiesektor vornehmen zu können.

Eine für unsere Zeit wichtige Qualifikation.

Es sollen in der Schule keine Klonierungsexperimente durchgeführt oder

transgene Organismen gezüchtet werden. Der Sinn der vorgestellten Experimente sind das Kennenlernen der biotechnologischen Verfahrensweise der Mikromanipulation, das Erleben und Verstehen eines anspruchsvollen Experiments und das Verinnerlichen des Zellaufbaus mit seinen verschiedenen Komponenten, die selbst erfahrbar und berührbar werden.

Die hier entwickelte Mikromanipulationsmethode ist eine Möglichkeit, Schülern die komplexen Zusammenhänge der Biotechnologie zu veranschaulichen und mit ihnen Experimente durchzuführen, die große Ähnlichkeit mit Forschungsexperimenten haben.

Gerade das Experimentieren auf diesem Niveau gibt den Schülern die Möglichkeit, Fähigkeiten und Fertigkeiten zu entwickeln, die nicht unbedingt mit den Standardversuchen in der Schule aktiviert werden können.

Der Schwierigkeitsgrad der Mikromanipulation ist sehr hoch, aber für ältere Schüler (ab 11. Klassenstufe) geeignet.

Es ist hervorzuheben, dass eine Zellmanipulation der hier vorgestellten Weise nicht in 45 Minuten zu schaffen ist.

Es bedarf einige Zeit, um die Fertigkeiten zu erlangen, Mikropipetten herzustellen und sie mit dem Mikromanipulator in eine Zelle einzuführen.

Als Lehrperson sollte die Technik gut beherrscht werden, um sie den Schülern zu vermitteln und ihnen praktisch bei der Mikromanipulation zu unterstützen.

Wenn die verschiedenen Arbeitsgänge,

1. Aufbau und Benutzung der Geräte
2. Ziehen der Mikropipette
3. Durchführung der Mikromanipulation

in drei eigenen Arbeitstagen einer „Projektwoche“ durchgeführt werden, ist das der richtige zeitliche Rahmen. Nach dem praktischen Arbeiten sollten die Versuche abschließend an einem ganzen Schultag ausgewertet, diskutiert und die gewonnenen Erfahrungen präsentiert werden. Bei dieser Gelegenheit sollte es nicht versäumt werden, Erlebnisse und neu gewonnen Erfahrungen in den alltäglichen Zusammenhang der Biotechnologie- und Gentechnikdiskussion zu stellen. Informative Literatur, die einer Diskussion die nötige Tiefe geben kann, ist am Ende des Artikels angegeben.

Hat der Schüler selbst einmal eine Mikromanipulation durchgeführt, und dabei ein Zelle (z.B. Zwiebelzelle mit Chloroplast) hergestellt die in der Form nicht in der Natur vorkommt, wird er merken, welches Potenzial in seinen Händen liegt und, übertragen auf Nukleus und Oozyte, welche Gefahren in dieser Technik stecken.

Ein Startpunkt für Diskussionen ist gelegt.

5 Schlusswort

Das vorgestellte Mikromanipulationsexperiment ermöglicht dem Schüler, aktiv in der Zelle zu arbeiten. Kein Zellmodell kann die Erfahrung vermitteln, in einer realen Zelle mit einem selbst hergestellten Werkzeug zu agieren. Jeder unter dem Lichtmikroskop sichtbare Zellbestandteil, sei es die Vakuole, der Zellkern oder ein Chloroplast kann mittels der Mikropipette „berührt“, verschoben und transportiert werden.

Dadurch wächst das Verständnis für den Aufbau der Zelle und gleichzeitig das Wissen über Zusammenhänge von Zellorganellen und Funktionen. Jeder, der einmal einen Zellkern in die Mikropipette aufgenommen oder Luft in die Vakuole eingblasen hat, wird dieses Erlebnis nicht so schnell vergessen und behält die Erfahrungen, verknüpft mit den Begriffen, länger im Gedächtnis.

Literatur

- NEUMANN, K. H. (1995): Pflanzliche Zell- und Gewebekulturen. Ulmer, Stuttgart
STECK, T. (2001): Praxis der Fortpflanzungsmedizin. Schattauer, Stuttgart

Vertiefende Literatur zur Thematik:

- BAYRHUBER, H., U. HARMS & A. KROB (Hrsg., 2001): Handbuch der praktischen Mikrobiologie und Biotechnik Bd 4: Unterrichtsmaterialien zu Gentechnik und Ethik. Metzler, Hannover
NELLEN, U. (1988): Schüler-Experimente mit pflanzlichen Gewebekulturen auf Fertigmitteln mit Hilfe eines selbstgebauten „Steril-Tunnels“. Praxis der Naturwissenschaft B 6/37, 33 - 37
NIEMITZ, C. (1999): Genforschung und Gentechnik – Ängste und Hoffnungen. Springer, Berlin
NISSEN, J. C. (1996): Genetik und Gentechnologie – Analysen und empirische Untersuchungen zu einem didaktischen Konzept. Deutscher Studien Verlag, Weinheim
REGENASS-KLOTZ, M. (2000): Grundzüge der Gentechnik. Birkhäuser, Basel

Verfasser: Gordon Dzemski, Inst. für Biologie, Auf dem Campus 1, 24937 Flensburg; dzemski@uni-flensburg.de

