

Biologische Oberflächen im Elektronenmikroskop

von Sophie Gysin, Praktikantin am ZMB

Zusammenfassung:

Meine Aufgabe in meinem zweiwöchigen Praktikum war es den Lotuseffekt genauer anzuschauen und anhand von zwei unterschiedlichen Tieren deren Haftorgane darzustellen. Zu Beginn untersuchte ich schon fertig präparierte Proben unter dem Rasterelektronenmikroskop, damit ich mich mit dem Gerät vertraut machen konnte. Aber innerhalb dieser beiden Wochen hatte ich genügend Zeit, um verschiedene Verfahren der Herstellung von Proben zu lernen. Ich habe verschiedenste Blätter präpariert und dann unter dem Rasterelektronenmikroskop ihre Oberflächen untersucht. Zuerst habe ich alle Proben mit der Kritischen Punkt-Trocknung präpariert und später auch noch die Kryopräparation erklärt bekommen. Einen Tag lang durfte ich auch mit dem Durchstrahlungsmikroskop (TEM) arbeiten. Dafür brauchten wir wieder eine andere Form des Präparierens, das Negativ-Stain.

Material und Methoden:

Kritische Punkt-Trocknung:

Als erstes werden mit einem Skalpell aus den Blättern kleine Vierecke herausgeschnitten, und zwar ca. 1cm auf 1cm. Dann legt man diese Proben 4-5 Stunden in 3 % Glutaraldehyd ein, um die Zellen zu fixieren. Nachher kommen sie 3-5 Minuten in ein PBS-Bad (Physiologische Kochsalzlösung; **Phosphate Buffered Saline**), um die Säure zu neutralisieren. Danach noch eine Minute in Wasser einlegen, bevor man mit in der Konzentration aufsteigenden Alkoholbädern beginnt. Zuerst nimmt man 30% Alkohol und lässt die Proben 10 Minuten darin liegen. Danach, auch immer mit der gleichen Zeit, in 50%, 70%, 90% und 100% Alkohol baden. Dies wird gemacht, um möglichst viel Wasser aus den Proben heraus zu kriegen. Aus der letzten Flüssigkeit wird aber die Probe nicht mehr an die Luft gelassen, sondern man macht sie direkt in den Kritischen Punkt-Trockner. Dort wird nun zuerst das in den Proben enthaltene Wasser durch Aceton und danach durch flüssiges CO₂ ersetzt.

Damit man die Phasengrenze flüssig-gasförmig nicht überschreiten muss, erhöht man nun den Druck und die Temperatur. Wenn der kritische Punkt erreicht wird (ein Punkt an dem keine Grenze zwischen flüssig und gasförmig existiert), gibt es keine Phasengrenze zwischen flüssig und fest mehr. Senkt man den Druck (Ablassen von CO₂) und die Temperatur später wieder, so hat man die Phasengrenze physikalisch umgangen. Die Präparate sind dann trocken ohne die Oberfläche durch einen Kollaps auf Ebene der Ultrastruktur zu beschädigen. Nun wird jede Probe auf einen kleinen "Teller" geklebt und zum Abschluss noch in den Sputter getan. Das ist eine Kammer, die unter Vakuum steht. Oben,

gegenüber der Probe, ist eine Goldfolie angebracht. Nachdem der Luftdruck gesenkt wurde, wird Argon-Gas (bis 10^{-1} mbar) in die Kammer eingelassen. Die Restluft wird ersetzt durch das inerte Argon-Gas. Durch Anlegen einer Hochspannung von ca. 1500 Volt wird eine Glimmentladung zwischen der Goldplatte und dem Gegenpol mit dem Präparat gezündet. Dabei entstehen positiv geladene Argon-Ionen, die nun zu der negativ geladenen Metallplatte mit der Goldfolie gezogen werden. Dort schlagen sie aus der Oberfläche Goldpartikel heraus. Diese kollidieren bei der Ausbreitung mit den Argon-Gasmolekülen und werden so mehrmals gestreut. So treffen sie diffus auf die Probe, welche nun einen leitfähigen und einige Atomlagen dünnen Goldüberzug bekommt. Danach sind sie Proben bereit, um im Elektronenmikroskop untersucht zu werden.

Kryopräparation:

Wie bei der Kritischen Punkt-Trocknung werden zuerst kleine Quadrate aus den Blättern geschnitten. Diese werden mit einem speziellen Leim direkt auf ein Träger-Plättchen geklebt. Der Leim ist bei Raumtemperatur flüssig und bei niedrigen Temperaturen hart. Danach wird diese Platte vorne auf einen speziellen Stab gesteckt. Der Stab wird in ein Gefäß mit flüssig Stickstoff (-196 Grad) eingetaucht, in der die Probe ultraschnell (10'000 Grad / Sekunde) eingefroren wird. In dieser Kammer wird nun Vakuum erzeugt und danach kommt die Probe direkt in eine gekühlte Vorkammer des Rasterelektronenmikroskops. Der Sinn besteht darin, bei diesem Stab mit den Proben vorne drauf ein transportierbares Vakuum zu machen. Die Probe ist nun in der evakuierten Präparationskammer und wird bei -80 Grad so lange gefriergetrocknet, bis eventuell durch Kondensation entstandenes Eis sublimiert ist. Nun müssen auch diese Proben mit Gold gesputtert werden. Der Sputter-Apparat ist direkt in der Präparations-Vorkammer integriert. Nachdem die Proben mit wenigen Atomlagen Gold versehen wurden, schiebt man sie durch eine Öffnung auf einen gekühlten Tisch in das Mikroskop. Dort herrscht eine Temperatur von -150 Grad Celsius. Die Proben werden bei dieser Temperatur abgebildet.

Durchstrahlungsmikroskop: Negativ Stain

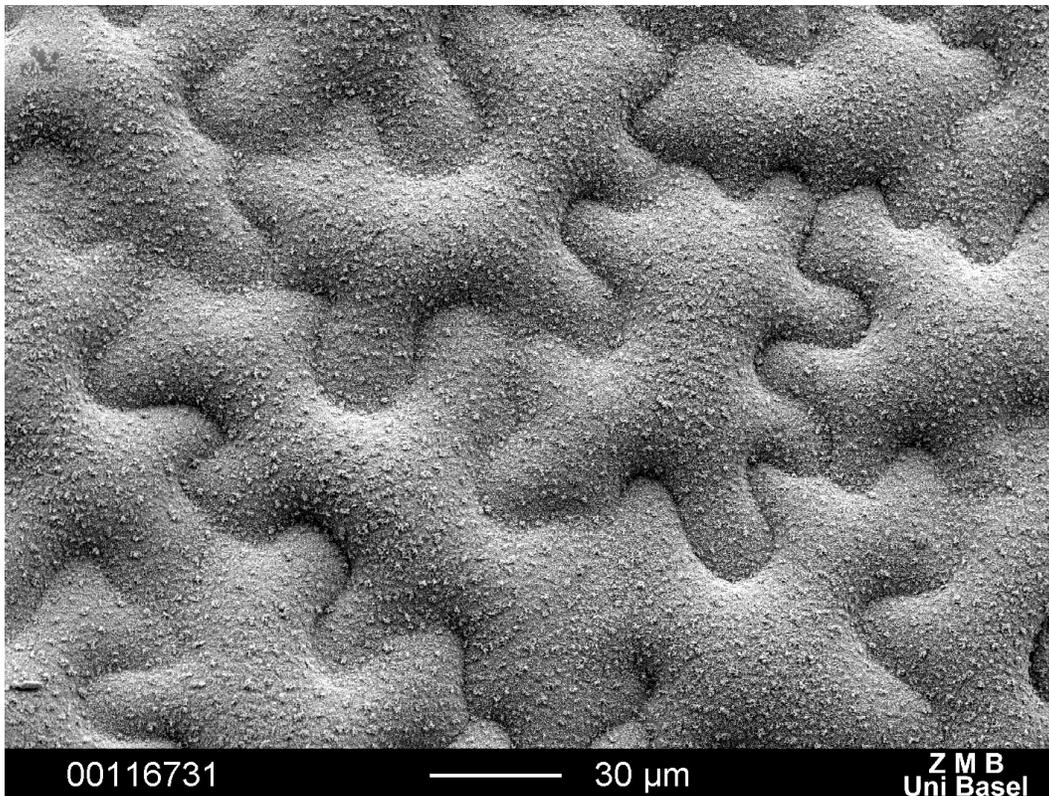
Negativ Stain ist eine Methode zur Kontrastierung von dünnen Objekten, die man auf einer Folie auf einem Gitternetz, genannt Grid, aufgebracht hat. Man adsorbiert aus einer Lösung mit Molekülen, Viren oder Bakterien 10 Sekunden lang Proben auf ein Grid. Dann wird zwei mal mit destilliertem Wasser gewaschen und anschliessend mit Uranylacetat (2% in Wasser) negativ gefärbt. Die Präparate werden an der Luft getrocknet, damit das Schwermetallsalz durch Kapillarität gleichmässig um die kleinen Strukturen abgelagert wird. Um die Oberfläche der Gridfolie gut benetzbar zu machen, wird das Grid vor der Adsorption in einem Restluft-Ionenplasma behandelt. Diese Behandlung nennt man Glow-Dischargen.

Resultate:

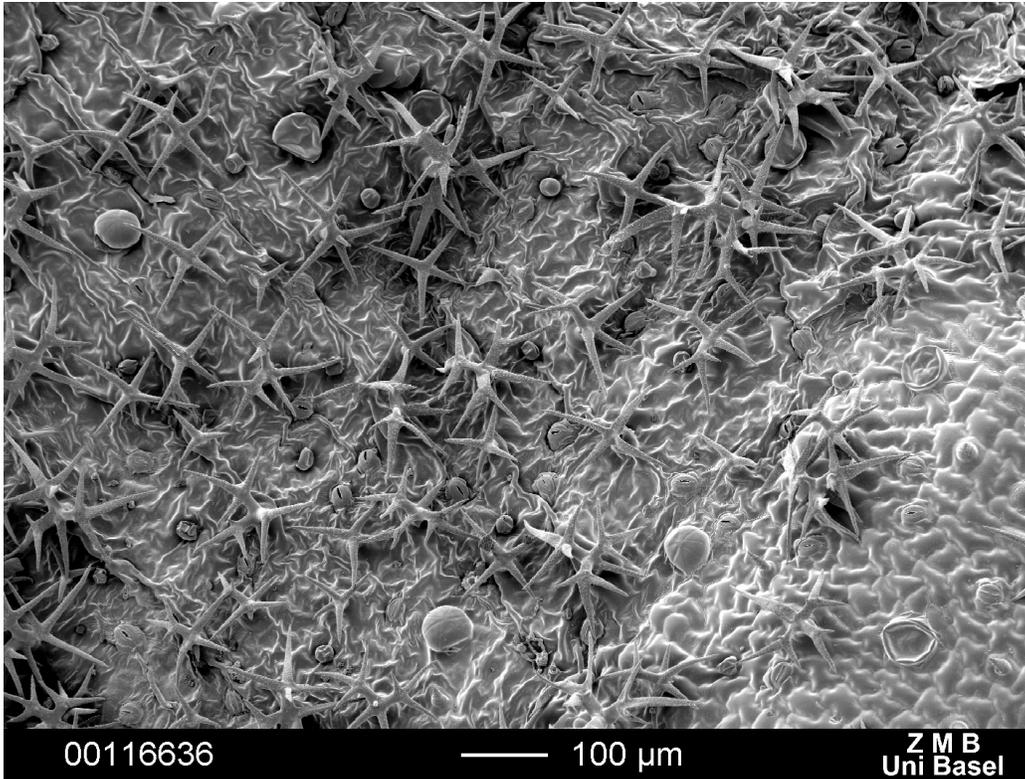
Lotuseffekt

Unter dem Mikroskop konnte ich die Oberflächen der ausgewählten Blätter genau betrachten. Ich habe mir folgende Pflanzen ausgesucht: Lavendel, ein Blatt der Rosskastanie, ein Blatt eines Erdbeer- und eines Brombeerstrauches, Zitronenmelisse, Klee, Kapuzinerkresse und ein Malvenblatt. Darunter waren nur zwei mit Lotuseffekt, der Klee und die Kapuzinerkresse. Der Lotuseffekt war erkennbar indem ein wenig Wasser auf das Blatt getropft wurde. Perlte das Wasser gleich wieder ab, war das ein Lotuseffekt. Gleichzeitig mit dem Abperlen reinigte sich die Oberfläche, da die Wassertropfen auch allen Schmutz mit sich wegspülten. Bei Blättern ohne Lotuseffekt verteilt sich ein Wassertropfen auf der Oberfläche und benetzt sie gut.

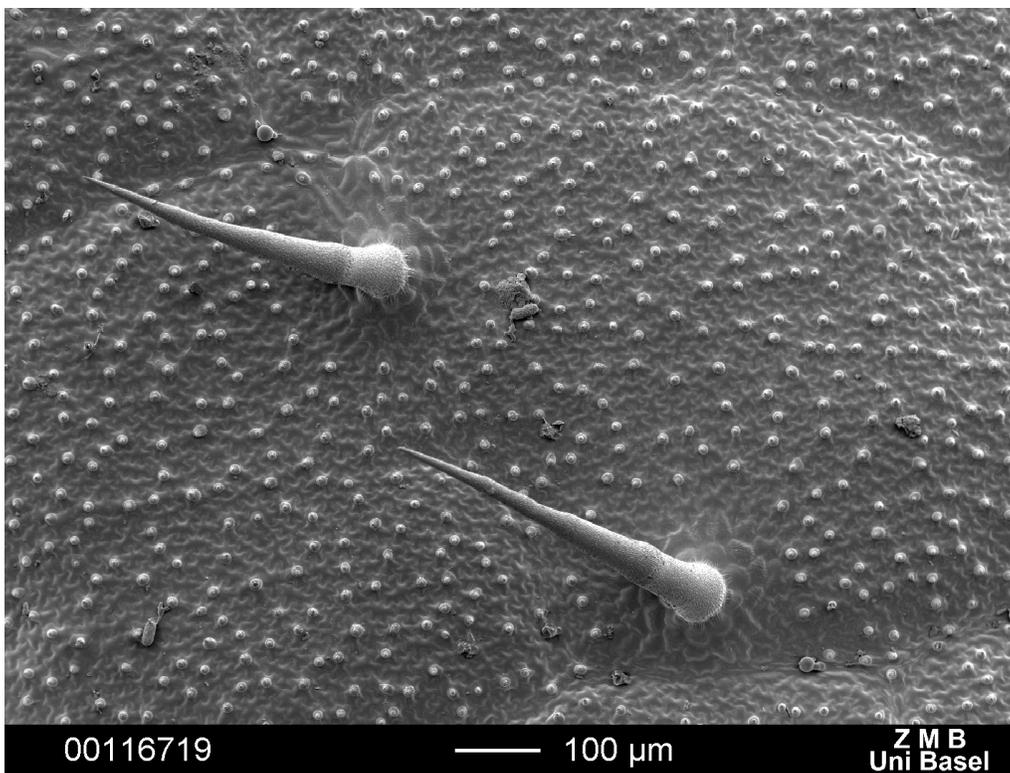
Erst unter dem Rasterelektronenmikroskop zeigten sich die Unterschiede in der Struktur der Oberflächen. Schon bei kleiner Vergrößerung fiel auf, dass der Klee und die Kapuzinerkresse einen regelmässigen Aufbau der Zellen hatten, wie eine Art Puzzle, bei dem alles perfekt zusammenpasst. Die Proben ohne Lotuseffekthaben auf der Oberfläche noch zusätzliche Organe wie Haare oder Duftstoffdrüsen. Diese wirken als Störungen auf der Oberfläche, wodurch der Lotuseffekt wahrscheinlich verhindert wird.



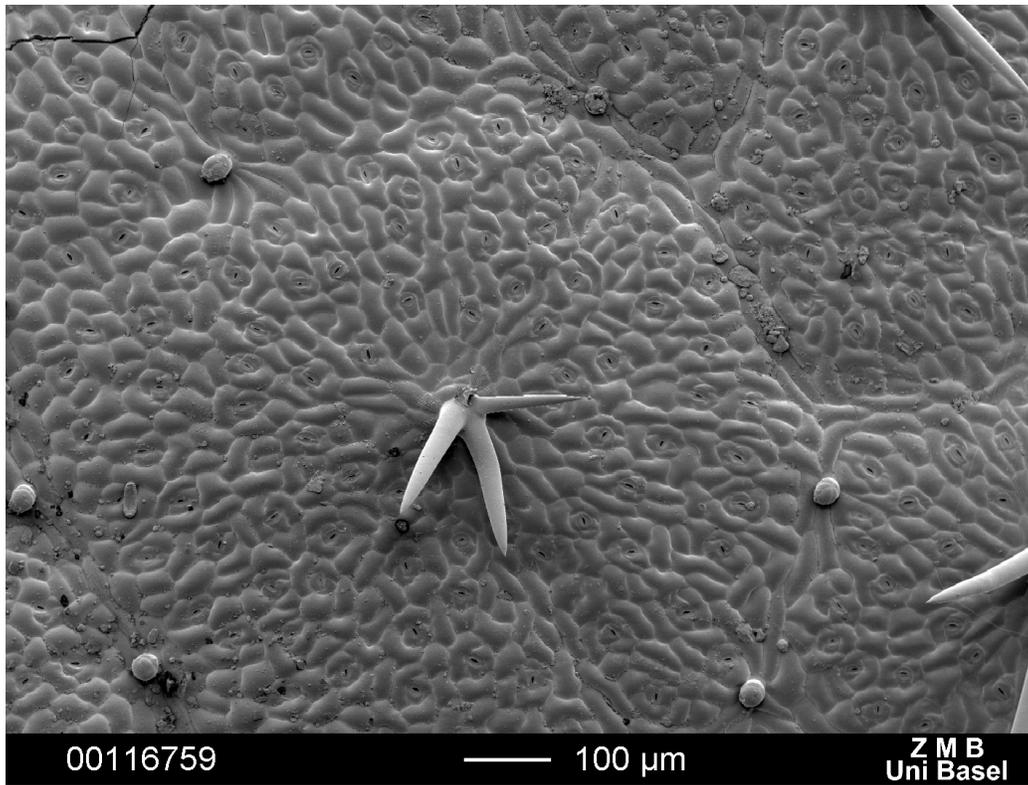
Das ist die Oberfläche der Kapuzinerkresse. Sie ist glatt und lässt eine noch feinere Oberflächenstruktur vermuten. Kryopräparation in 500-facher Vergrößerung.



Der Lavendel hat eine sehr haarige und keineswegs glatte Oberfläche. Dies sieht man schon bei 100-facher Vergrößerung und mit der CPD-Methode präpariert.

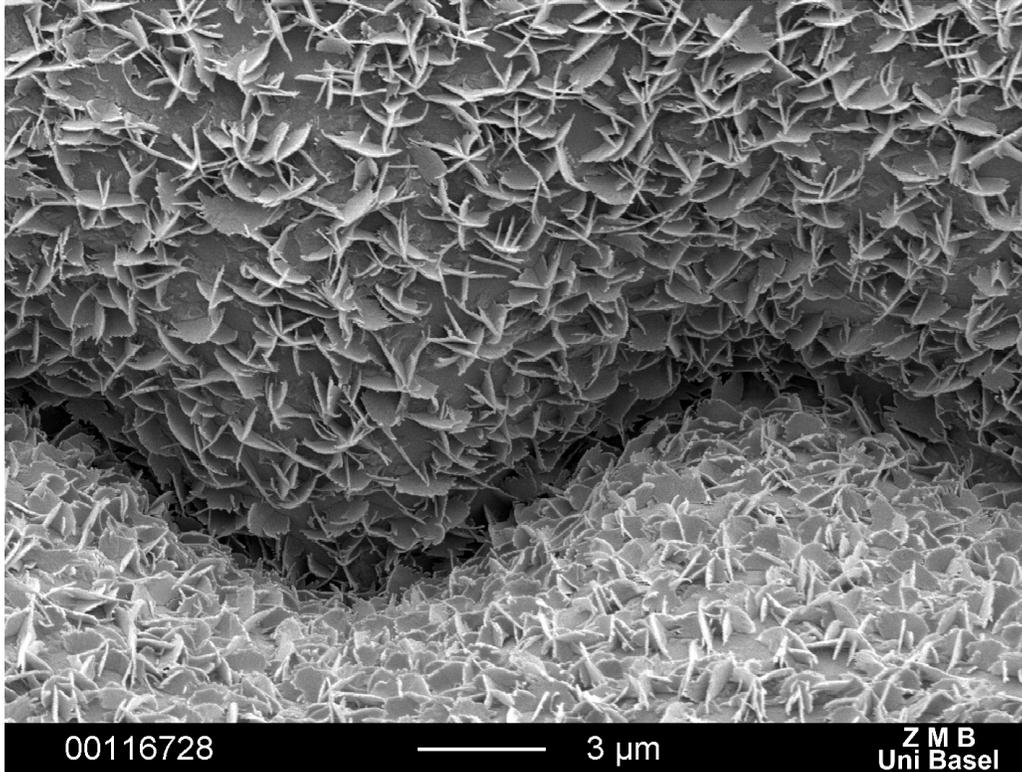


Auch die Struktur der Zitronenmelisse ist viel zu wenig eng und zu haarig, als dass ein Lotuseffekt entstehen könnte. (100-fache Vergrößerung mit der Kryopräparation)

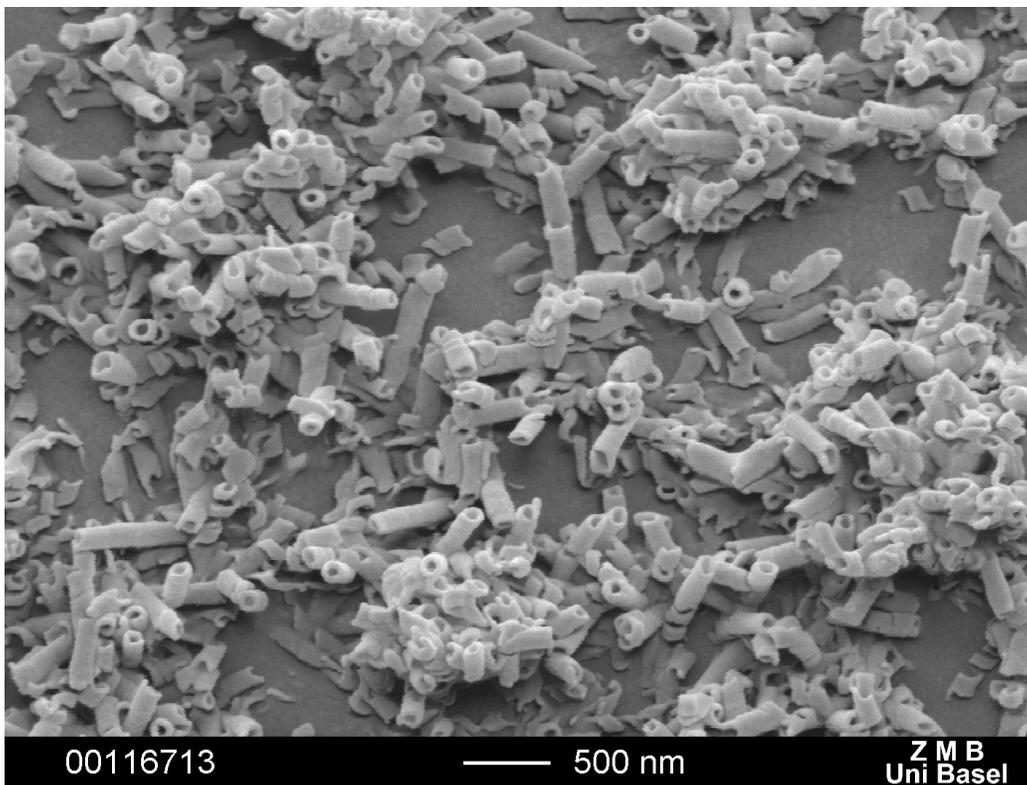


Ebenso das Malvenblatt (100-fache Vergrößerung und mit der kryo Methode präpariert)

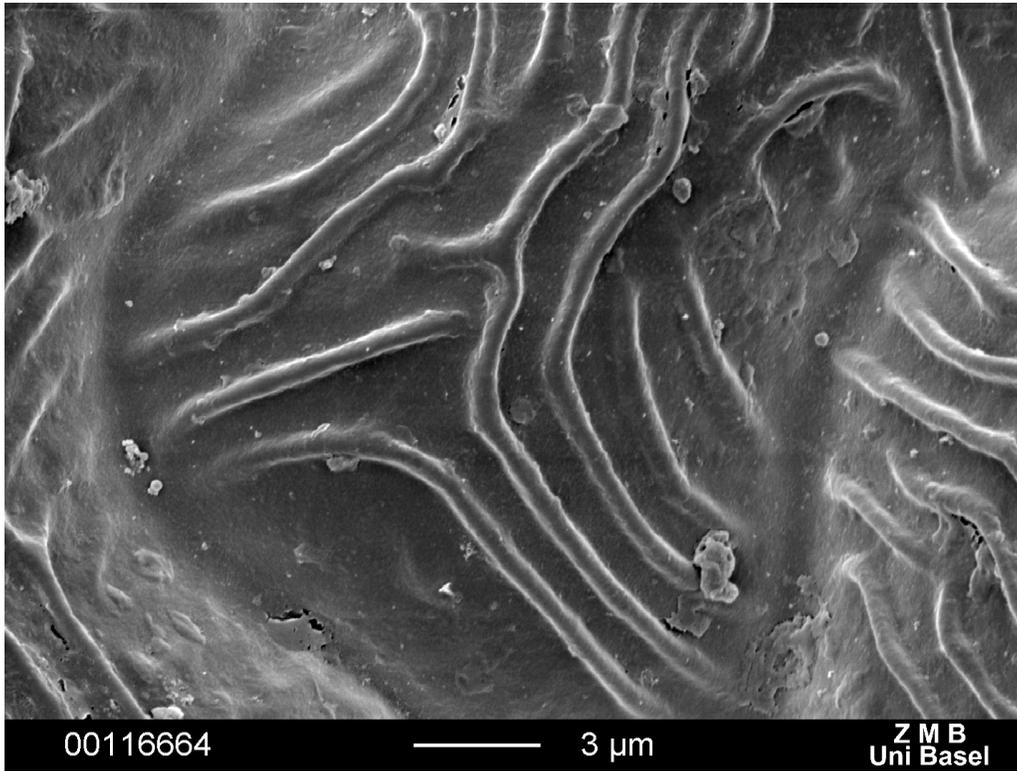
Betrachtet man die Blätter mit Lotuseffekt bei hohen Vergrößerungen wird auf den Zellen der Blattoberfläche eine Ultra-Struktur erkennbar, wie vermutet. Bei der Kapuzinerkresse sieht diese aus wie kleine Röhren und beim Klee wie Sterne. Diese Strukturen ziehen sich über die gesamte Oberfläche jeder Zelle. Wenn man bei den anderen Blättern ohne Lotuseffekt die gleiche Vergrößerung anwendet, findet man keine solchen regelmässigen und feinen Strukturen. Manche haben schon ein Muster wie zum Beispiel die Rosskastanie. Dieses ist jedoch nicht so dicht und fein.



Die schöne Architektur auf der Oberfläche des Klees in 5000-facher Vergrößerung und mit Kryopräparation.



Die Struktur der Kapuzinerkresse ist feiner und kleiner als die des Klees. Der Lotuseffekt basiert auf feinen Kapillarröhrchen (20'000-Fache Vergrößerung und eine Kryopräparation)



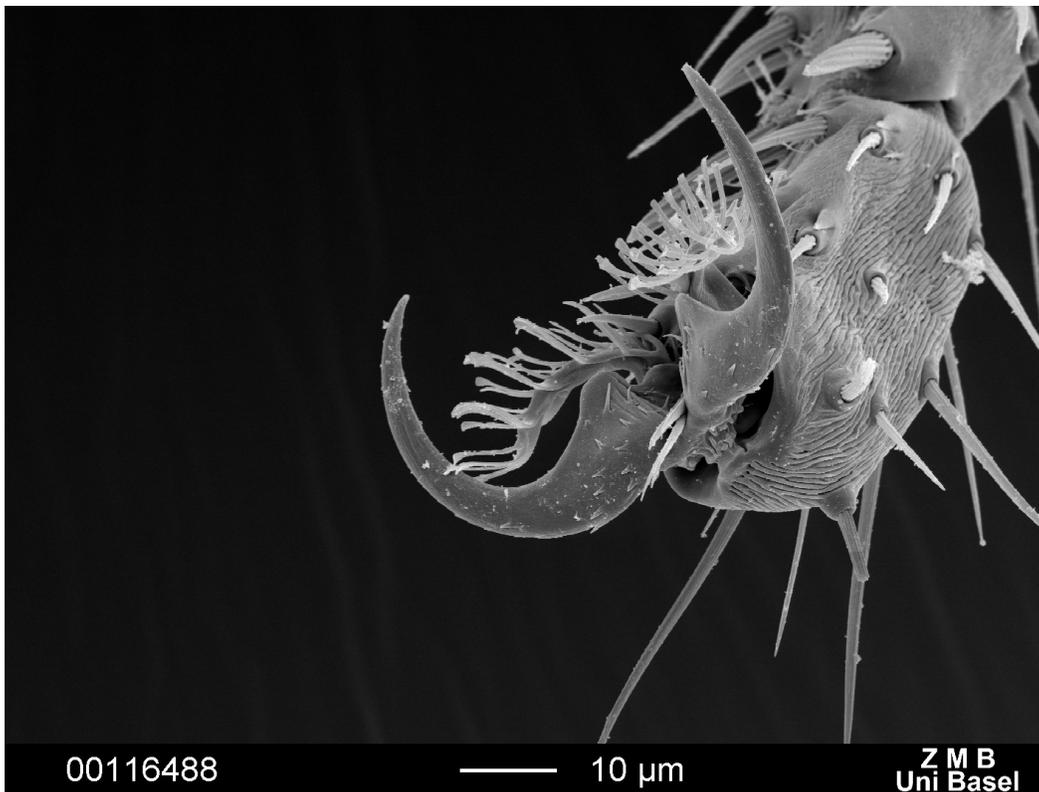
Die Roskastanie hat eine Oberflächenstruktur, aber nicht so dicht und fein. (5000-fache Vergrößerung und eine CPD-Präparation)

Haftorgane

Neben der Abbildung des Lotuseffekts betrachtete ich auch zum Thema "Haftorgane" zwei verschiedene Proben unter dem Elektronenmikroskop. Als erstes konnte ich eine schon fertige Probe der *Drosophila Melanogaster* (Fruchtfliege) anschauen. An der Spitze ihrer Beine kann man ihre Haftorgane sehen. Es gibt zwei verschiedene Systeme. Zuvorderst die aus zwei Haken bestehende Greifzange und weiter hinten am Bein die zwei geweihartig verästelten Organe mit Saugnäpfen an der Spitze jedes Endes. Mit diesen Werkzeugen ausgerüstet können die Fliegen kopfüber laufen oder an glatte Oberflächen wie Glasscheiben anhaften.



Makroaufnahme *Drosophila Melanogaster*

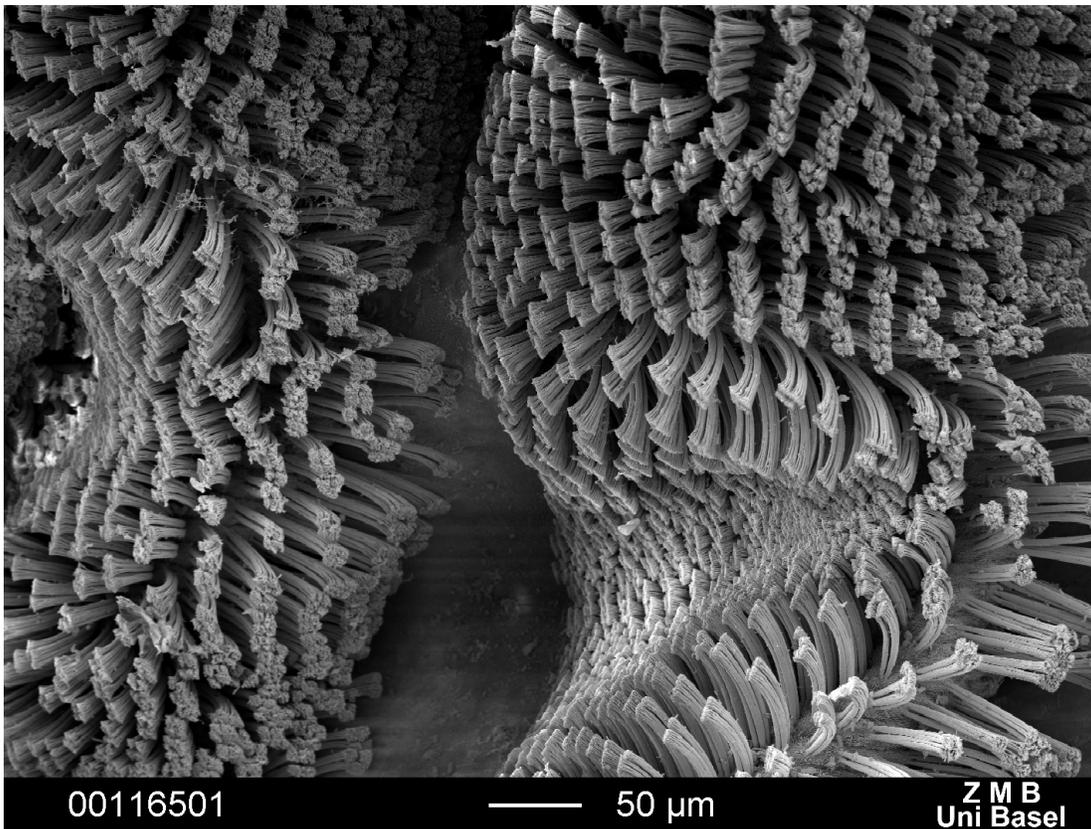


Dies ist die Spitze eines Laufbeines der *Drosophila* mit den zwei Typen von Haftorgan.

Ein anderes Tier, welches ebenfalls keinen Halt vor steilen Wänden kennt ist der Gecko. Auch seine Füsse habe ich unter dem Mikroskop untersucht und festgestellt, dass beim Gecko an jedem Fussglied auch bürstenartige Haftorgane mit Saugnäpfen an der Spitze jeder Borste sind. Doch ist dieses Haftorgan viel grösser und dichter als die Saugnäpfe bei der Drosophila. Dies ist verständlich ist, denn das Körpergewicht des Geckos ist um einiges höher als das der Drosophila.



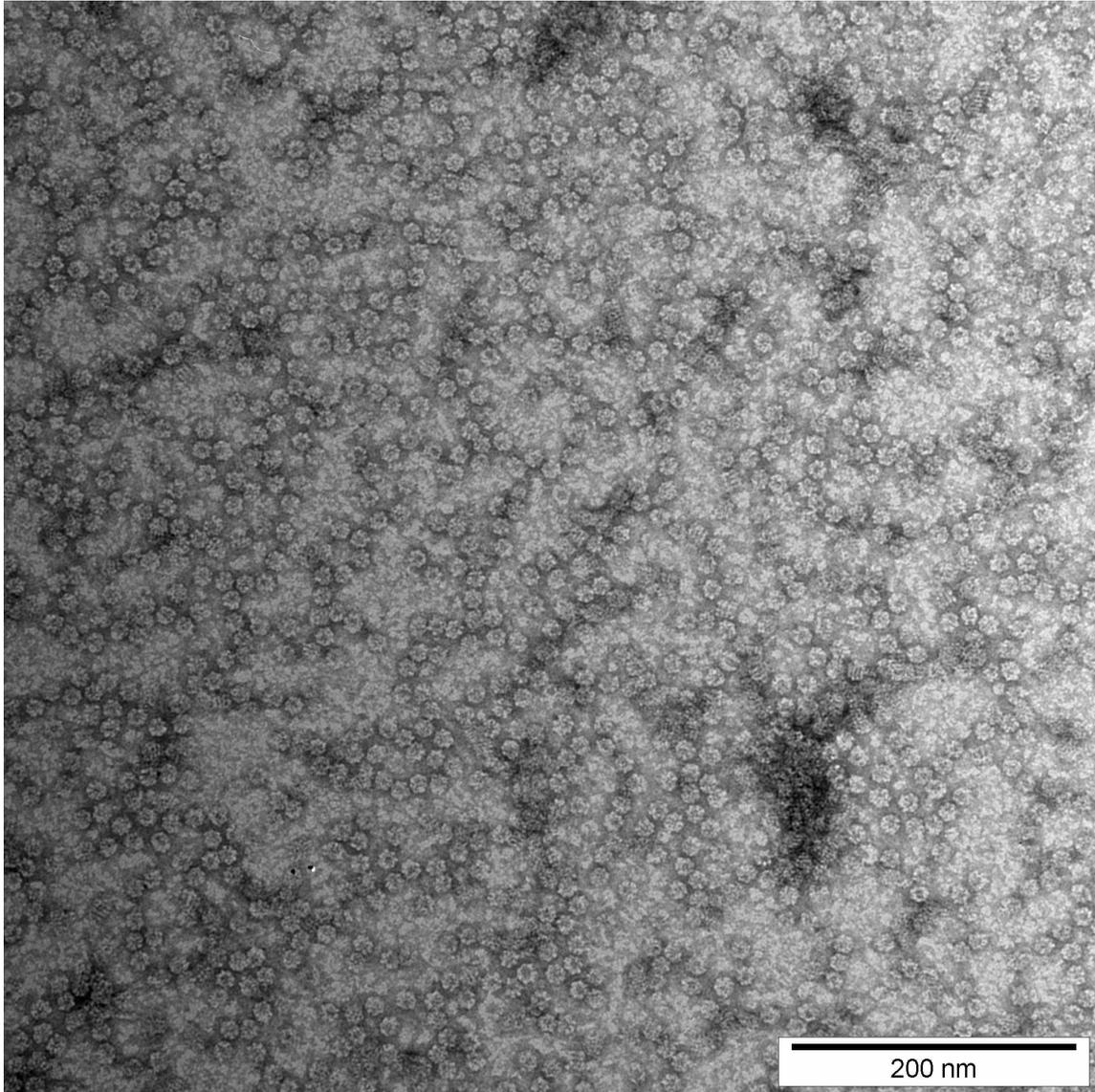
Makroaufnahme von Geckos an einer Hauswand



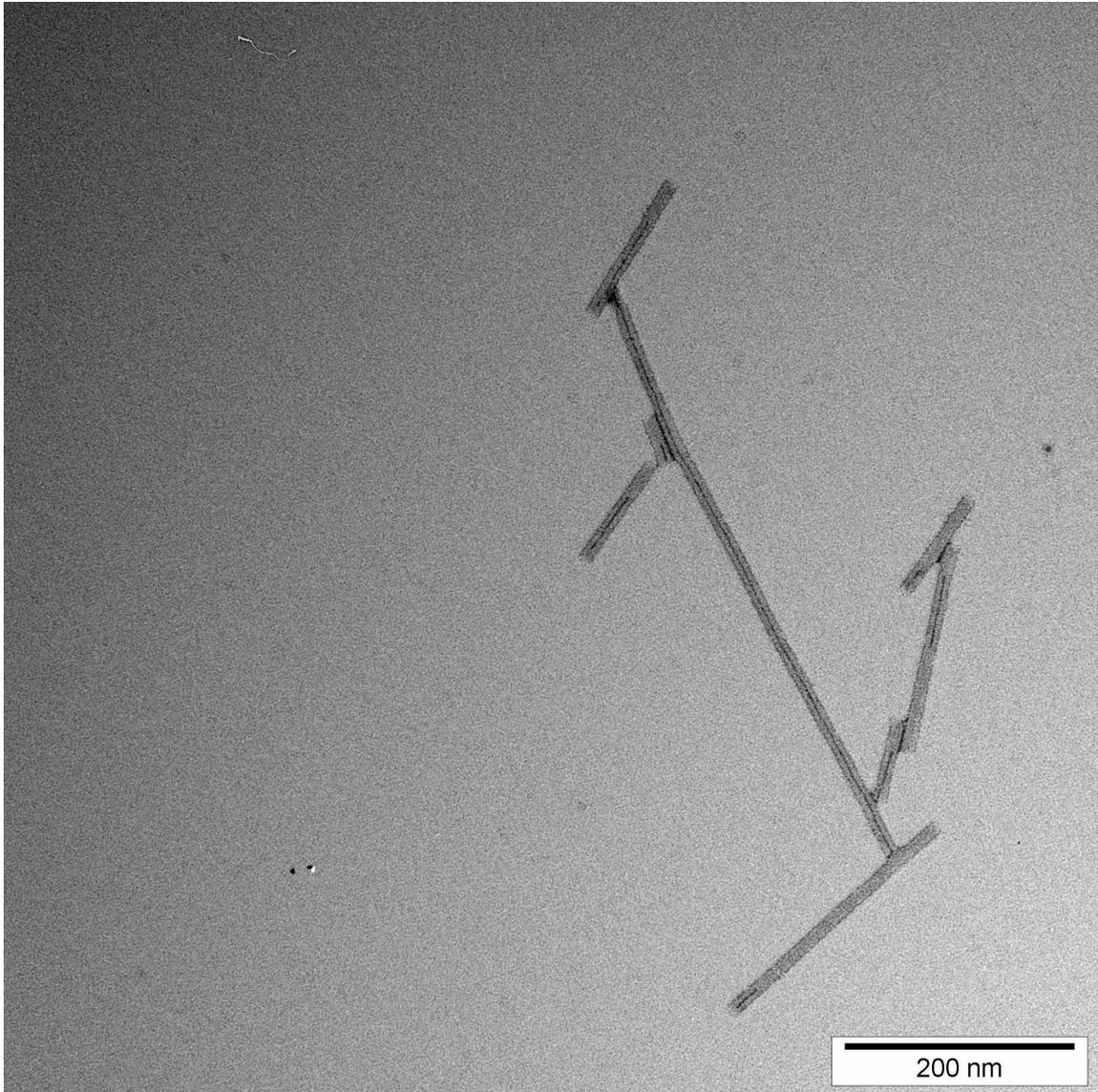
Ein Ausschnitt des Haftorgans an den Füessen des Geckos.

Negativ Stain

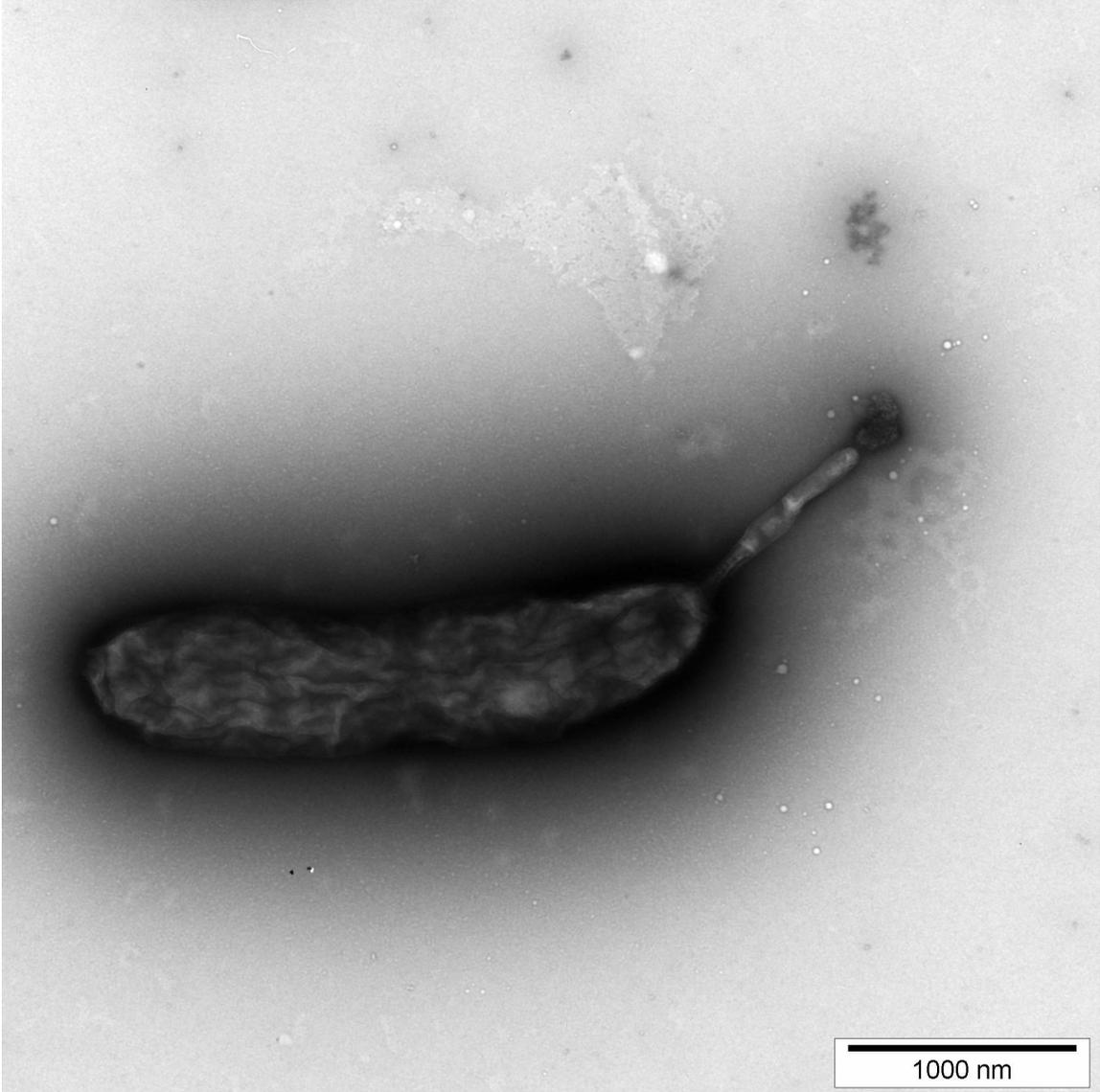
Für das Durchstrahlungsmikroskop (TEM) habe ich folgende Präparate mit Negativ Stain angefertigt: als Vertreter für Moleküle das GroE_L, als Vertreter für Viren das Tabakmosaikvirus (TMV) und als Vertreter für Bakterien das Wasserbakterium Caulobacter.



GroE_L ist ein ringförmiges Protein aus sechs Untereinheiten. Es dient Zellen als Vorlage zum Zusammenbau von anderen Molekülen (Chaperonin). Für diese Aufnahme wurde es aus dem Darmbakterium E.coli isoliert und gereinigt (Vergrößerung 110'000x; Negativ Stain; Mikroskop TEM)



Das Tabak Mosaik Virus ist ein stäbchenförmiges RNA-Virus. Die Proteinhülle besteht aus vielen helikal zu einem Röhrchen angeordneten Untereinheiten. In de Mitte des Röhrchens sieht man die Erbinformation als dunklen Strich(Vergrößerung 89'000x; Negativ Stain; Mikroskop TEM)



Caulobacter, ein Wasserbakterium in unseren Gewässern. Es kann sich mit seinem Haftorgan, dem Stalk auch in stark fließenden Umgebungen anhaften. Es ist für Mensch und Tier ungefährlich (Vergrößerung 18'000x; Negativ Stain; Mikroskop TEM)

Diskussion

Bei meinem ersten Kontakt mit der Elektronenmikroskopie ging nicht alles auf antrieb gut. Ich habe beispielsweise bei der CPD-Präparation den Fehler gemacht, die Proben aus dem Alkohol zu nehmen und an der Luft zu trocknen. Dies sieht man jetzt bei den Aufnahmen in Form von kollabierten Kleinstrukturen an Oberflächen und es sieht generell geschrumpft aus. Doch ich war und bin immer noch Anfängerin und dieses Thema war absolutes Neuland für mich.

Der Lotuseffekt wurde von mir weder entdeckt, noch habe ich mich wirklich lange damit auseinandergesetzt, ich bin keine ausgebildete Biologin und ich habe bis jetzt auch nicht vor eine zu werden. Doch das ganze Praktikum machte mir Spass und ich habe viele neue Dinge gelernt und gesehen.

Referenzen

<http://de.wikipedia.org/wiki/Lotuseffekt>