

Lernlabor **Biologie**

Neuronen im Verbund

Histologie & Fluoreszenzmikroskopie

Der Labortag

Der Labortag zur Neurobiologie beschäftigt sich mit der strukturellen und funktionellen Organisation von Nervenzellen im Verbund. Alle Versuche werden mit isolierten Segmentalganglien des medizinischen Blutegels (*Hirudo medicinalis*) durchgeführt. Ziel der Versuche ist es, mit modernen optischen Verfahren, Größenverhältnisse und die strukturelle und funktionelle Entwicklung von Nervenzellverbänden zu erforschen und nachzuvollziehen zu können.

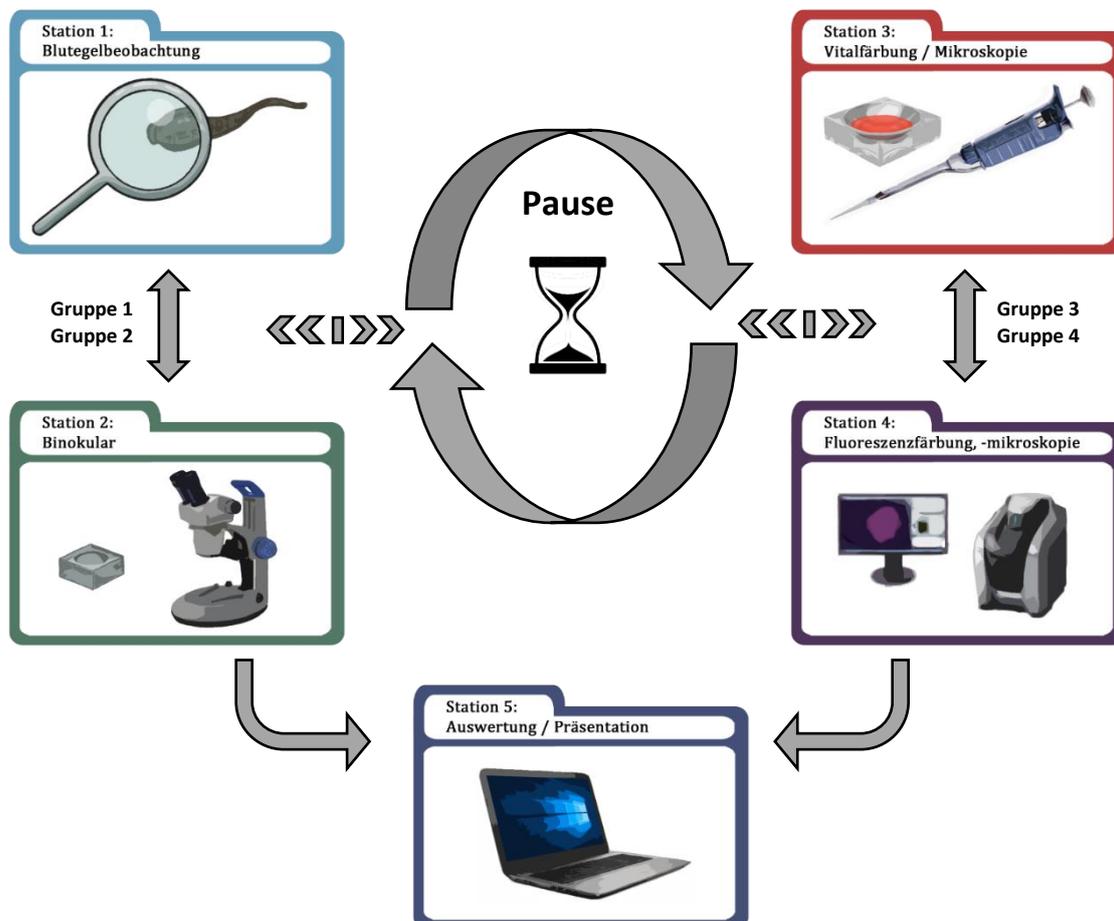
Präparat

- Isolierte Segmentalganglien von *Hirudo medicinalis*

Methoden

- Durchlichtmikroskopie, Fluoreszenzmikroskopie
- Computergestützte Datenerfassung und Datenauswertung

Stationsübersicht





Station 1: Blutegelbeobachtung

Aufgabe: Ordnen Sie den medizinischen Blutegel einem der angegebenen Tierstämme zu.

- Fangen Sie zwei Egel aus dem Aquarium und überführen Sie diese in die bereitgestellten Bechergläser.

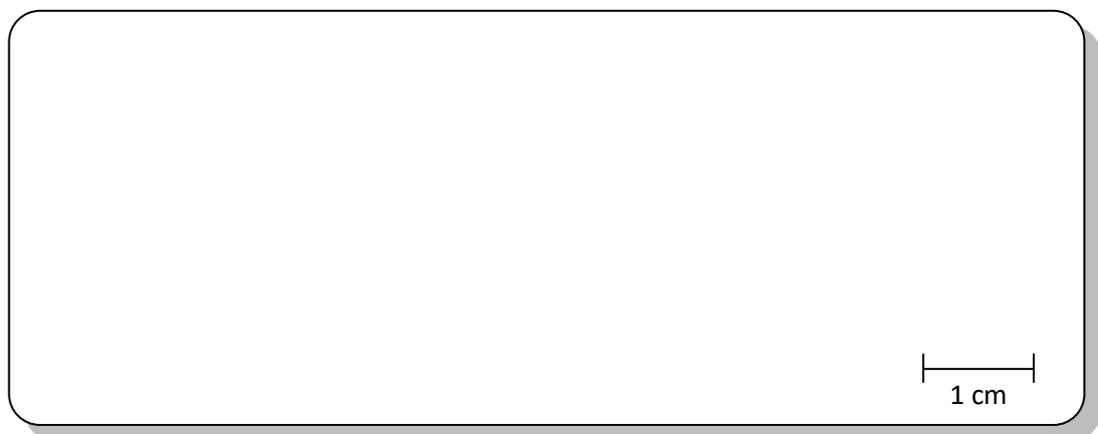
Bitte jeweils nur ein Tier pro Becherglas mit Wasser gefüllt!

X	Tierstamm	Körperbau	Beispielarten
	<i>Plathelminthes</i> (Plattwürmer)	- abgeplattet - unsegmentiert	→ kl. und gr. Leberegel → Saugwürmer → Bandwürmer
	<i>Nemathelminthes</i> (Schlauchwürmer)	- drehrund - unsegmentiert - fadenförmig	→ Rund- und Fadenwürmer → Saitenwürmer
	<i>Annelida</i> (Ringelwürmer)	- segmentiert - besitzt Körperringe	→ Regenwurm → Wattwurm → Tubifex

X = Kreuzen Sie in dieser Spalte den richtigen Tierstamm an.

- Betrachten Sie den Blutegel genau und fertigen sie eine Skizze an.

Skizze:





Aufgabe

- Beobachten Sie die Tiere in den Bechergläsern und tragen Sie Ihre Beobachtungen in die Tabelle ein.

Ergebnisse ihrer Beobachtung:

Körperlänge (in cm)	
Rückenfärbung	
Bauchfärbung	
Anzahl der Saugnäpfe	
Wo befindet sich die Mundöffnung?	
Beschreibung der Schwimmbewegung	
weitere Verhaltensbeobachtungen	

Station 2: Binokular



Aufgabe: Beurteilen Sie die Größe der Segmentalganglien des Blutegelnervensystems zunächst mit bloßem Auge.

- Betrachten Sie das Segmentalganglion zunächst mit bloßem Auge und fertigen Sie eine Skizze auf der nächsten Seite an. (Stellen Sie dazu das Blockgläschen auf einen dunklen Hintergrund)
- Geben Sie in Ihrer Skizze einen Maßstab an (rechts unten z.B. 1cm).

Beschriften Sie ihre Skizze mit den Strukturen, die Sie schon zuordnen können.

Station 2



Skizze:



Aufgabe: Betrachten Sie das Segmentalganglion unter dem Binokular und fertigen Sie erneut eine Skizze an.

- Betrachten Sie das Ganglion bei verschiedenen Vergrößerungsstufen unter dem Binokular
- Greifen Sie dazu das Ganglion mit einer Pinzette und versuchen Sie die Lage des Ganglions zu variieren.
- Skizzieren Sie das Ganglion erneut in verschiedenen Lagen und geben Sie wiederum einen Maßstab an.
- Beschriften Sie ihre Skizzen mit den Ihnen schon bekannten Strukturen.

Skizze:





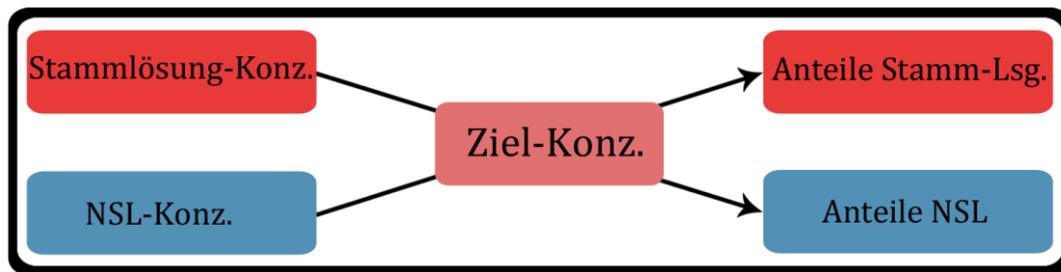
Station 3 Vitalfärbung / Mikroskopie

Ein Segmentalganglion wird mit dem Vitalfarbstoff Neutralrot gefärbt und unter dem Mikroskop betrachtet. Das Präparat muss dazu in einen Spezialträger überführt werden (Betreuer fragen). Die Mikroskope sind mit Kameras versehen und mit Tablets verbunden, so dass die Bilder in der Gruppe besprochen, Fotos erstellt und ausgedruckt werden können.

Herstellung der Vital-Versuchslösungen

Aufgabe: Im Blockschälchen werden zwei Segmentalganglion mit einer 500 μ M bzw. 100 μ M Neutralrotlösung eingefärbt.

- Stellen Sie aus einer 1 mM Neutralrotstammlösung und einer NSL eine 500 μ M und eine 100 μ M Versuchslösung her. Verwenden Sie dazu das Mischungskreuz:

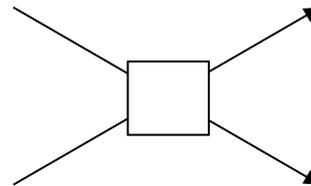
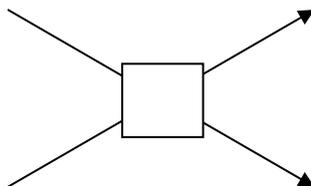


Mischungsanteile:

Anteil Stammlösung = Ziel-Konz - NSL-Konz.

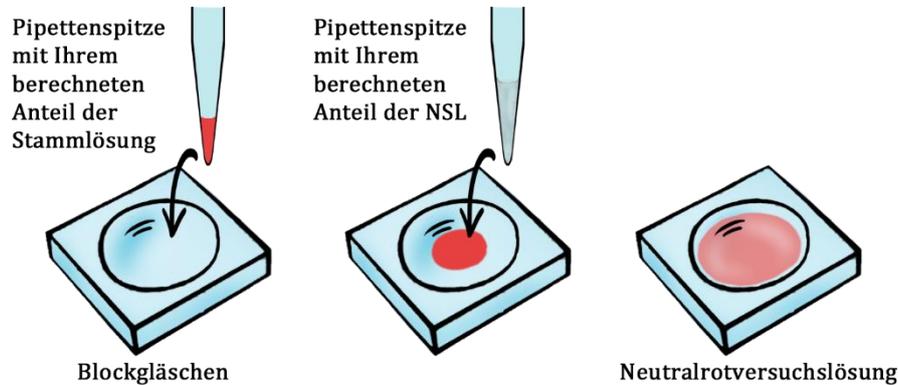
Anteile NSL = Stammlösung-Konz - Ziel-Konz

Wie viel Volumen der einzelnen Lösungen werden eingesetzt?





Die Herstellung der Neutralrotversuchslösung erfolgt mit Hilfe einer Eppendorf-Pipette in bereitgestellten Blockgläschen.

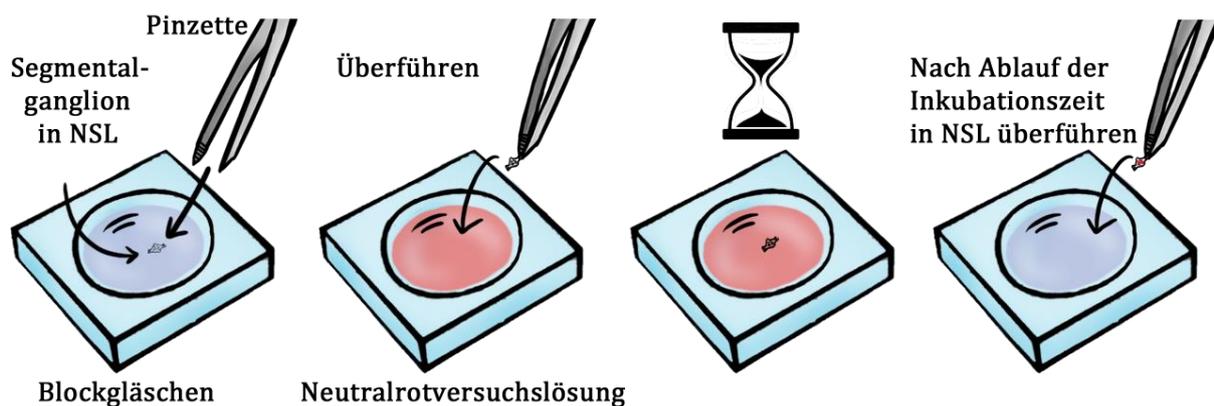


Färbung des Segmentalganglions mit Neutralrot

Aufgabe

- Vor der Einfärbung des Präparats muss ein Zeitnehmer aus der Gruppe bestimmt werden, der die Einhaltung der 3-minütigen Inkubationszeit (bei 100 μM) bzw. 1-minütigen Inkubationszeit (bei 500 μM) überwacht.

Färbeanleitung:

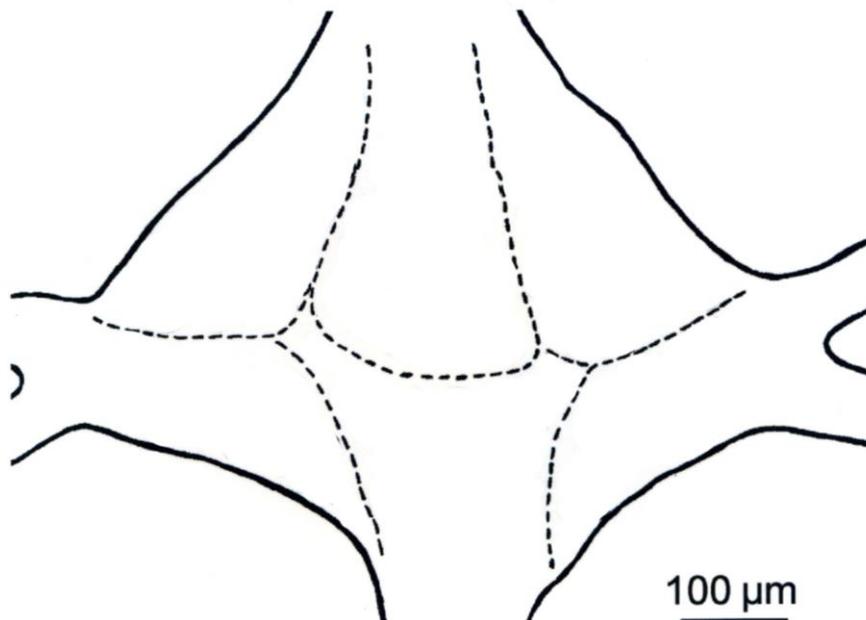




Betrachtung des gefärbten Segmentalganglions unter dem Mikroskop

- Betrachten Sie das gefärbte Präparat unter einem der bereitstehenden Mikroskope und fertige Sie Fotos an.
- Welche und wie viele Strukturen wurden eingefärbt? Zeichnen sie ein!

Gefärbte Strukturen:





Station 4: Fluoreszenzfärbung / Fluoreszenzmikroskopie

In diesem Versuch wird ein Segmentalganglion (pro Gruppe) mit dem Fluoreszenzfarbstoff Propidiumiodid gefärbt. Mit unterschiedlichen Fluoreszenzfiltern wird das Segmentalganglion unter dem Mikroskop betrachtet und die Bilder miteinander verglichen.

Informationen zum Fluoreszenzfarbstoff Propidiumiodid

Propidiumiodid (PI) ist ein Fluoreszenzfarbstoff, der DNA färbt. Es lagert sich zwischen zwei gestapelte Basenpaare der DNA-Doppelhelix ein (interkaliert) und verändert dadurch seine Fluoreszenzeigenschaften. Das Absorptionsmaximum von Propidiumiodid liegt im interkalierten Zustand bei einer Wellenlänge von 535 nm, das Emissionsmaximum bei 617 nm. PI ist membran*im*permeabel (nicht membrangängig), sodass es nicht ohne weiteres von außen in Zellen eindringen kann. Um dies zu gewährleisten, ist es nötig die Zellmembranen vorher zu perforieren – hierzu dient Triton X 100.

Informationen zu Triton X 100

Triton X 100 wird eingesetzt, um integrale Membranproteine komplett aus der Zellmembranen zu lösen und die Membran dadurch zu perforieren.

Sicherheitshinweis Fluoreszenzfärbung

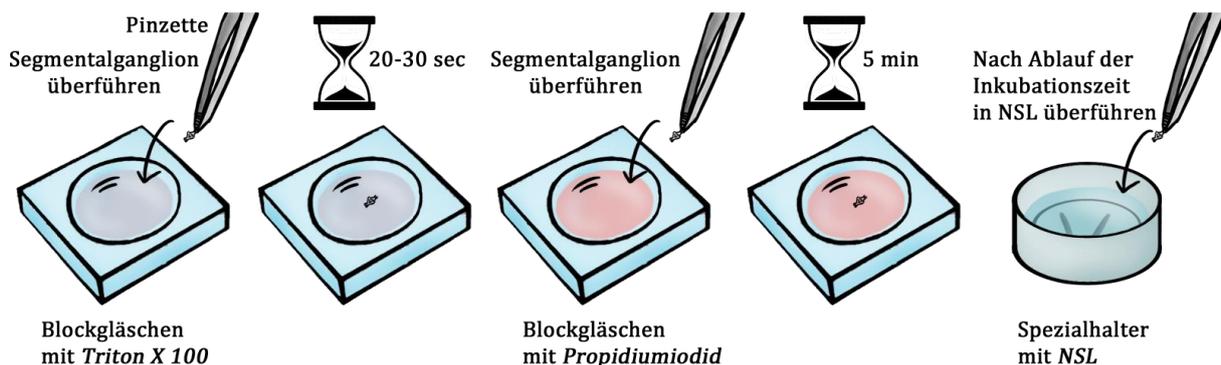
Während des Arbeitens mit **Triton X 100** und **Propidiumiodid** ist unbedingt Sicherheitskleidung (Kittel, Schutzbrille und Handschuhe) zu tragen. Mit Triton X 100 und Propidiumiodid wird nur an dem dafür vorgesehenen Arbeitsplatz gearbeitet!



Aufgabe: Führen Sie die Fluoreszenzfärbung durch und bereiten Sie das Präparat für das Fluoreszenzmikroskop vor.

Durchführung der Fluoreszenzfärbung

- Bestimmen Sie eine Person aus der Gruppe als Zeitnehmer zur Einhaltung der Inkubationszeiten und eine Person, welche die Färbung durchführt (Sicherheitskleidung).
- Bereiten Sie zwei Blockgläschen mit den Versuchslösungen vor. Ein Gläschen wird mit 1 ml Triton X 100, das andere mit 1ml Propidiumiodid gefüllt.
- Entnehmen Sie danach ein Segmentalganglion mit einer Pinzette und überführen Sie es in das Blockschälchen mit Triton X 100. Die Inkubationszeit beträgt **20-30 Sekunden** (genaue Parameter beim Versuchsleiter erfragen).
- Unmittelbar danach wird das Segmentalganglion in das Blockschälchen mit Propidiumiodid überführt. Die Inkubationszeit in der Färbelösung beträgt **ca. 5 min**.
- Abschließend wird das Segmentalganglion in einen Spezialhalter der mit Neutralsalzlösung (NSL) gefüllt ist überführt.
- Das Fluoreszenzpräparat wird von einem Versuchsleiter in dem Spezialhalter für die Mikroskopie fixiert.





Fluoreszenzmikroskopie

Das Fluoreszenzmikroskop kann als Fluoreszenzmikroskop sowie als normales Durchlichtmikroskop verwendet werden. Im Durchlichtmodus werden zunächst Bilder, die später zur Vermessung der Ganglienstrukturen dienen, angefertigt.

Aufgabe: Betrachten Sie das gefärbte Segmentalganglion unterm Mikroskop. Variieren Sie dabei Parameter wie Belichtung, Vergrößerung und Fluoreszenzbedingungen (Filterwechsel). Dokumentieren Sie ihr Vorgehen mithilfe von Fotos.

Durchführung der Fluoreszenzmikroskopie

Ein Versuchsleiter gibt Ihnen eine Einweisung in die Handhabung des Mikroskops und hilft bei der Erstellung der Fotodokumentation.

- **Folgende Bilder werden vom Präparat im Durchlicht-Modus angefertigt:**
 1. Übersicht des Segmentalganglions
 2. Aufnahme der Konnektive des Segmentalganglions
 3. Aufnahme der Retzius-Neuronen
 4. *(zusätzlich möglich)* weitere Fotos mit interessanten Details in unterschiedlichen Vergrößerungsstufen, Fokusebenen und Belichtung

- **Folgende Bilder werden vom Präparat im Fluoreszenz-Modus angefertigt:**
 5. Übersicht Segmentalganglion mit „GFP-Filter“
 6. Übersicht Segmentalganglion mit „TexasRed-Filter“
 7. Übersicht Segmentalganglion mit „DapiBlue-Filter“



Station 5: Auswertung / Präsentation

Die Fotos werden mittels der Analysesoftware „BZ-Analyser“ vermessen. Die Datendarstellung erfolgt in Microsoft PowerPoint.

Aufgabe: Vermessen Sie das Segmentalganglion und tragen Sie ihre Ergebnisse in die zur Verfügung gestellte Excel-Datei ein. Fertigen Sie zum Abschluss eine ppt-Präsentationen an, in der Sie ihre Ergebnisse präsentieren.

Durchführung - Auswertung

- Ein Versuchsleiter gibt Ihnen eine Einweisung in die Handhabung der Analyse-Software.
- Übertragen Sie Ihre Daten via USB-Stick auf den Auswertrechner.
- Starten Sie das Programm "BZ-Analyser".
- Vermessen Sie folgende Strukturen und notieren Sie Ihre Messergebnisse in der nachfolgenden Tabelle.

Tabelle: Vermessung der neuronalen Strukturen

Struktur	Ergebnis in μm
Durchmesser des Segmentalganglions	
Durchmesser des Retzius-Neuron (1)	
Durchmesser des Retzius-Neuron (2)	
Breite eines Konnektivs	

Durchführung-Präsentation

Fügen Sie folgende Ergebnisse in die zur Verfügung gestellte ppt-Maske ein:

- Übersichtsbild des gesamten Segmentalganglions
- Messwerte und Diagramme aus der Excel-Datei
- Foto der Vitalfärbung (vom Tablet)
- Fotos der Vermessung
- Fluoreszenzbilder

Literatur

Muller, K. J., Nicholls J. G., Stent G. S. (1981) *Neurobiology of the Leech*. Cold Spring Harbour Laboratory. New York.

Nicols, J. G. & Van Essen, D. (1997) *The nervous system of the leech*. Scientific American 230: 38 – 48.

Schäfer, M. (2002) *Brohmer – Fauna von Deutschland*. Quelle & Meyer Verlag. Wiebelsheim.

Riehl, B. & Schlue, W. R. (1990) *Localization of carbonic anhydrase in identified glial cells of the leech central nervous system: application of histochemical and immunocytochemical methods*. J. Histochem. Cytochem. 38: 1173 – 1178.

Internet

<http://mek.oszk.hu/03400/03408/html/2979.html>

http://commons.wikimedia.org/wiki/Image:Sv%C3%B8mmende_blodigle.JPG

https://www.micro-shop.zeiss.com/de/de_de/spektral-info.php?i=Objekt-0000-241

<http://www.applichem.com/produkte/produktdetail/as/tritonreg-x-100-fuer-die-molekularbiologie/>

<http://www.mikroskopie.de/kurse/navigation/fluoreszenz/kurs.htm>

<http://www-dick.chemie.uni-regensburg.de/studium/files/pc22.pdf>

Sicherheitshinweise (AppliChem, 2008)

Propidiumiodid (PI)

- **Mögliche Gefahren:**
 - Reizt die Augen, die Atmungsorgane und die Haut
- **Schutzmaßnahmen und Verhaltensregeln:**
 - Vorsichtige Handhabung
 - Handschuhe
 - Schutzbrille
 - Kittel
- **Erste – Hilfe – Maßnahmen:**
 - Nach Einatmen: Frischluft. Arzt hinzuziehen.
 - Nach Hautkontakt: Mit reichlich Wasser abwaschen. Kontaminierte Kleidung entfernen.
 - Nach Augenkontakt: Mit reichlich Wasser bei geöffnetem Lidspalt ausspülen. Augenarzt hinzuziehen.
 - Nach Verschlucken: Viel Wasser trinken lassen, Erbrechen auslösen. Arzt hinzuziehen.

Triton X 100

- **Mögliche Gefahren:**
 - Gesundheitsschädlich beim Verschlucken. Gefahr ernster Augenschäden.
- **Schutzmaßnahmen und Verhaltensregeln:**
 - Vorsichtige Handhabung
 - Handschuhe
 - Schutzbrille
 - Kittel
- **Erste – Hilfe – Maßnahmen:**
 - Nach Einatmen: Frischluft. Bei Unwohlsein Arzt hinzuziehen.
 - Nach Hautkontakt: Mit reichlich Wasser abwaschen. Kontaminierte Kleidung entfernen.
 - Nach Augenkontakt: Mit reichlich Wasser bei geöffnetem Lidspalt ausspülen. Augenarzt hinzuziehen.
 - Nach Verschlucken: Vorsicht bei Erbrechen. Aspirationsgefahr!

Merck - TU Darmstadt

Lernlabor **Biologie**

Name:

Schule:

Gruppe:

Anmeldung unter:

lernlabor@bio.tu-darmstadt.de

Homepage:

<https://www.biolernlabtudarmstadt.de>