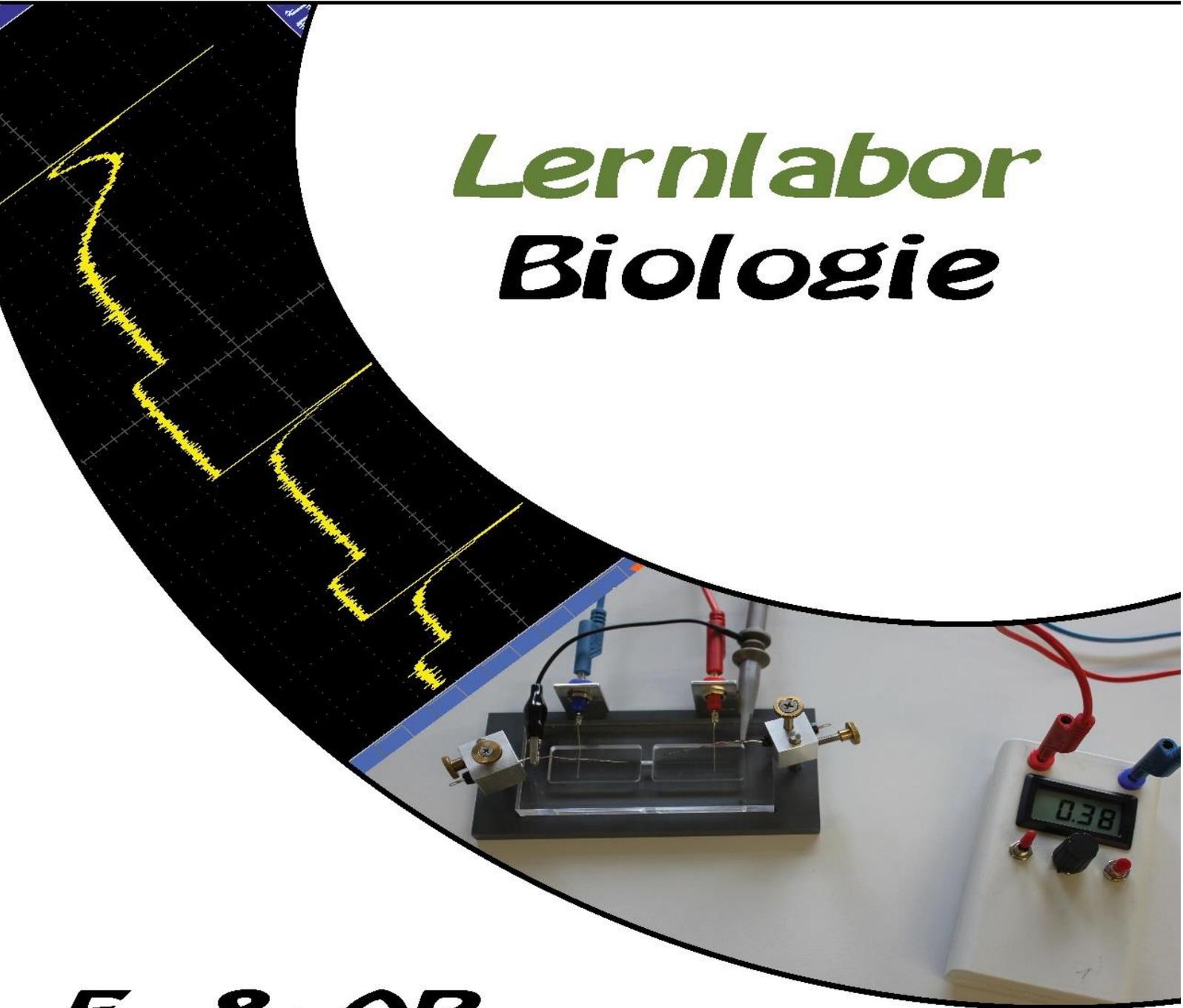


Lernlabor **Biologie**

E_m & AP bei Pflanzenzellen

Elektrophysiologie



Was erwartet Sie?

Der Labortag zur Elektrophysiologie beschäftigt sich mit schnellen Pflanzenbewegungen, die durch elektrische Potentialänderungen über den Zellmembranen initiiert werden. Als Präparate werden Internodialzellen der Armelechteralge *Chara corallina* und die Fangblätter der Venusfliegenfalle *Dionaea muscipula* verwendet.

Mittels der Kalium-Anästhesiemethode wird es möglich die Potentialdifferenz an der Zellmembran einer Internodialzelle der Armelechteralge auf extrazellulärem Wege abzuleiten und zu analysieren. Ziel des Versuches ist es Aktionspotentiale bei pflanzlichen Zellen auszulösen, um diese auf ionaler Ebene zu charakterisieren und zu verstehen.

Durch elektrische Ableitungen an den Fangblättern der Venusfliegenfalle kann gezeigt werden, dass der Schließmechanismus der Fangblätter erst durch Aktionspotentiale initiiert wird. Potenzialänderungen verursachen dabei letztendlich eine Änderung des osmotischen Drucks in bestimmten Zellschichten, wodurch die schnelle Blattbewegung ausgelöst wird.

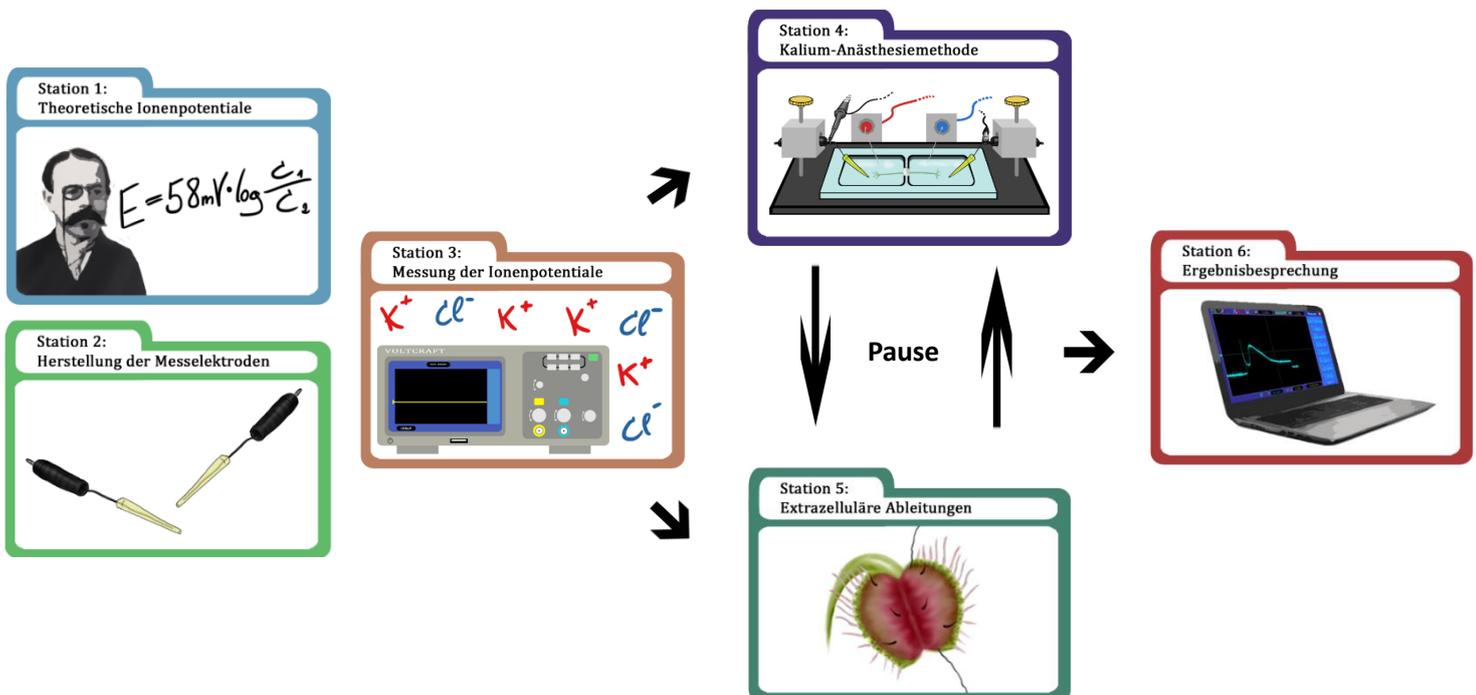
Präparat

- Internodialzellen der Armelechteralge *Chara corallina*
- Fangblätter der Venusfliegenfalle *Dionaea muscipula*

Methoden

- Extrazelluläre Ableitungen mittels der Kalium–Anästhesiemethode
- Extrazelluläre Ableitungen mittels Platinelektroden

Stationsübersicht





Station 1: Theoretische Ionenpotentialdifferenz

Informationen zum Membranpotential

Zellmembranen trennen das Cytoplasma vom Extrazellulärraum. Ist die Membran für nur eine Ionensorte selektiv permeabel, stellt sich bei unterschiedlich hoher Konzentration dieser Ionen, über der Membran ein Ionengleichgewichtspotential ein. Durch elektrische Ableitung des Intrazellulärums („innen“) gegen den Extrazellulärraum („außen“) als Referenz, lässt sich eine elektrische Potentialdifferenz über der Membran in Form einer Spannung messen. Diese Potentialdifferenz wird auch als Membranpotential (E_m) bezeichnet und ist entgegengesetzt gleich groß dem chemischen Gradienten der permeablen Ionensorte. Durch die Nernst-Gleichung lässt sich diese Spannung theoretisch berechnen.

Aufgabe

Berechnen Sie die Ionengleichgewichtspotentiale für Kalium (K^+) und Chlorid (Cl^-) bei den gegebenen Ionenkonzentrationen. Tragen Sie ihre Ergebnisse in die Tabelle und im Diagramm ein.

Nernst-Gleichung:

Für einwertige Kationen:

$$E = 58mV \cdot \log \frac{c_{au\ddot{a}}\text{u}\ddot{a}en}{c_{innen}}$$

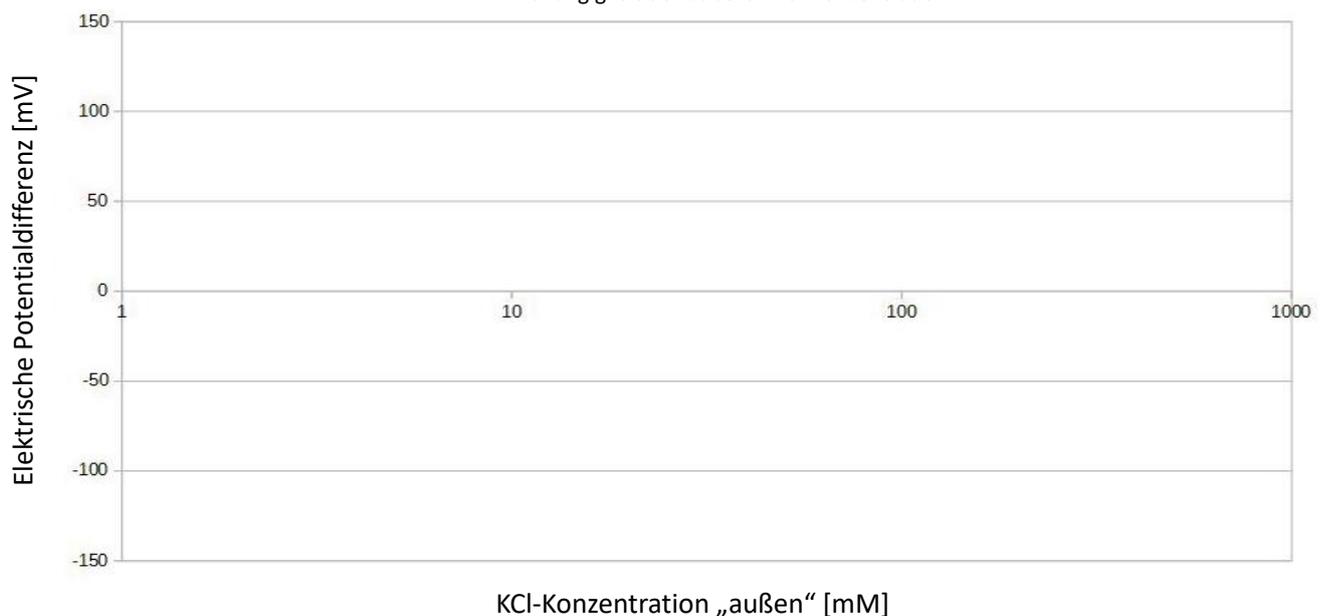
$$E = -58mV \cdot \log \frac{c_{au\ddot{a}}\text{u}\ddot{a}en}{c_{innen}}$$

Für E = elektrische Potentialdifferenz [mV]
 c = Konzentration der Ionensorten innen bzw. außen [mol/l] (bei 20 °C Raumtemperatur)

Ionenverteilung:

K ⁺ -Konzentration „innen“ [mM]	K ⁺ -Konzentration „außen“ [mM]	E _{K⁺} [mV] (berechnen Sie)	Cl ⁻ -Konzentration „innen“ [mM]	Cl ⁻ -Konzentration „außen“ [mM]	E _{Cl⁻} [mV] (berechnen Sie)
100	1		100	1	
	10			10	
	100			100	
	1000			1000	

Elektrische Potentialdifferenz
in Abhängigkeit der äußeren KCl-Konzentration





Station 2: Herstellung der Messelektroden

Informationen zu Agar

Agar ist ein elektrisch nichtleitendes Polysaccharid. Die benötigte elektrische Leitfähigkeit der Messelektroden wird durch die Einlagerung von K^+ - und Cl^- -Ionen (KCl-Lösung) in die Gitterstruktur des Agar gewährleistet. Die Ionen selbst können weder wandern, noch chemische Reaktionen eingehen, Elektronen können jedoch zwischen den Ionen weitergeleitet werden (elektrische Leitfähigkeit).

Aufgabe

Stellen Sie eine **2%-ige** Agarlösung in 1M KCl her.

Durchführung

- Berechnen Sie die benötigte Agarmenge für 30 ml Lösung [$1g \triangleq 1ml$]: g
Wiegen Sie die berechnete Menge Agar-Pulver an der Waage ab (Wiegeschale verwenden) und füllen Sie es in den 100 ml Erlenmeyerkolben um.
- Messen Sie 30 ml 1 M KCl – Lösung im Messzylinder ab und geben Sie diese auf den Agar.
- Stellen Sie den vorbereiteten Erlenmeyerkolben in die Mikrowelle.

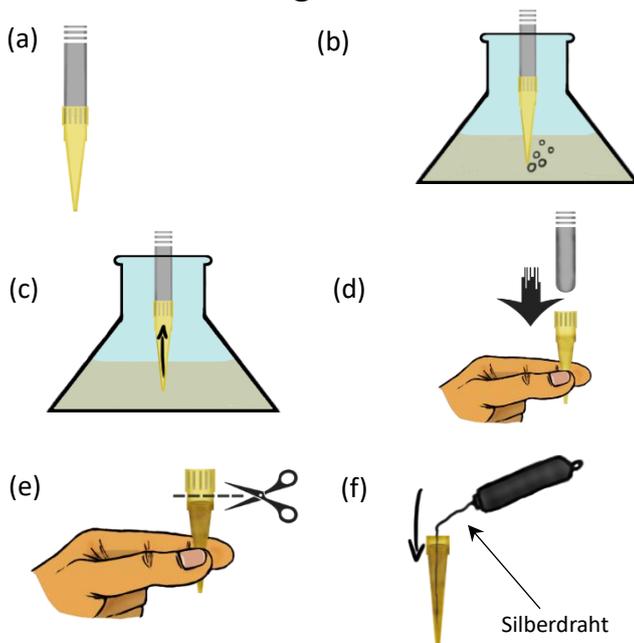
ACHTUNG: Schutzbrille und Hitzeschutz-Handschuhe tragen! Ein Betreuer muss vor Ort sein!

- Holen Sie den Erlenmeyerkolben mit einem Hitzeschutz-Handschuh aus der Mikrowelle.

Aufgabe

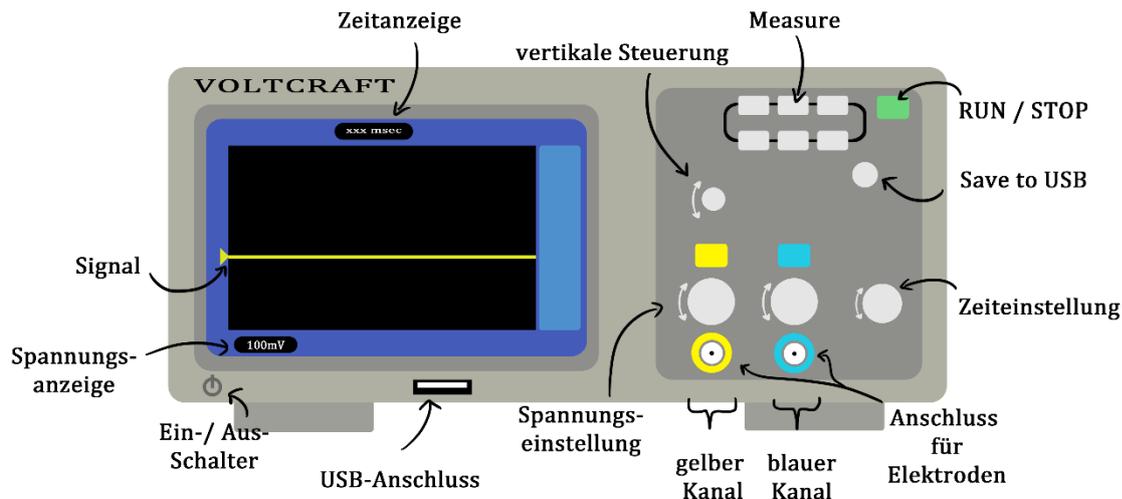
Befüllen Sie zwei gelbe Pipettenspitzen mit der noch flüssigen Agar-Lösung und hängen Sie zur Fertigstellung der Elektroden jeweils einen chlorierten Silberdraht ein.

Durchführung



- Nehmen Sie die gelbe Pipette (100 μ l) und setzen Sie eine gelbe Pipettenspitze auf **Abb. (a)**.
- Drücken Sie bis zum ersten Druckpunkt und tauchen Sie die Spitze in die Agar-Lösung.
Achtung: nicht den Boden berühren!
- Warten Sie bis die komplette Luft entwichen ist **Abb. (b)**.
- Steigen keine Blasen mehr auf, ziehen Sie langsam die Agar-Lösung in die Pipettenspitze **Abb. (c)**. Warten Sie noch 2-3 Sekunden bevor Sie die Pipette aus der Lösung nehmen.
- Ziehen Sie die Pipettenspitze anschließend mit den Fingern ab **Abb. (d)**.
Achtung: Es dürfen sich keine Luftblasen im Agar befinden!
- Schneiden Sie die Pipettenspitze mit der Schere knapp oberhalb des Gels ab **Abb. (e)**.
- Setzen Sie den chlorierten Silberdraht ein **Abb. (f)**.

Info: Bedienung des Oszilloskops



Ein-/ Aus-Schalter: Das Oszilloskop wird hier ein- oder ausgeschaltet.

Zeitanzeige: Die Intervalldauer eines Kästchens auf dem Display wird Ihnen hier in Millisekunden [ms] angezeigt. Dieses Intervall lässt sich mit der Zeiteinstellung verändern.

Zeiteinstellung: Die maximal beobachtbare Zeitspanne lässt sich durch Änderung der Intervalllänge einstellen.

Spannungseinstellung: Der beobachtbare Spannungsbereich lässt sich durch Änderung der Intervallhöhe einstellen.

Spannungsanzeige: Die mit der Spannungseinstellung eingestellte Spannung wird hier abgelesen. Diese sollte 50-100mV betragen.

Signal: Die kontinuierlich durch die Ableitelektrode gegen die Referenz gemessene Messgröße (in unserem Fall Spannung) wird hier als Liniendiagramm dargestellt.

Vertikale Steuerung: Die Darstellung des Nullpunktes der Y-Achse auf dem Display lässt sich hier einstellen.

Measure: Verschiedene Messwerte werden auf dem Display eingeblendet. Wichtig ist der Mittelwert (Mean) in Millivolt [mV]. Um die Messung zu resettet, Run/Stop-Taste drücken.

Anschluss für Elektroden: Die Messelektroden werden hier mittels Bajonettverschluss angeschlossen.

Gelber und blauer Kanal: Die Messelektrode wird hier angeschlossen. Ein- oder Ausblenden des Signals durch betätigen des blauen/gelben Knopfes.

Run / Stop: Die „run“-Funktion des Signals auf dem Display lässt sich hier pausieren oder erneut starten. Die Messung des Mittelwerts „Mean“ kann durch Stoppen und erneutes Starten resettet werden.

Save to USB: Ein Screenshot wird auf dem USB-Stick erstellt. Dies unbedingt vor der Messung testen.

Info: Messelektrode



Anschluss ans Oszilloskop:

Die Messelektrode wird am gelben oder blauen Kanal des Oszilloskops angeschlossen.

Ableitelektrode: Das Signal wird hier im Verhältnis zur Referenz erfasst.

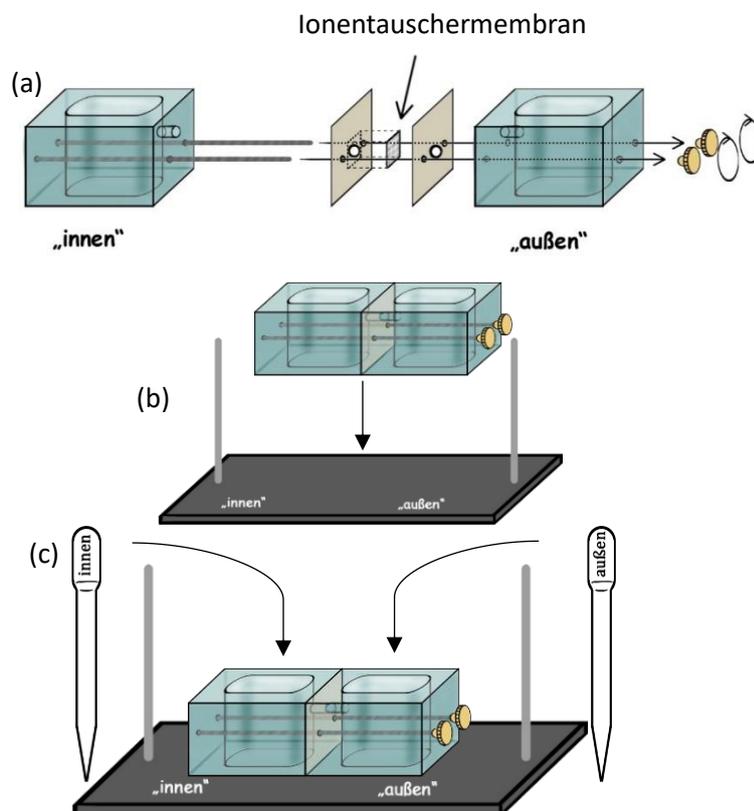
Referenz: Der Standard (relativer Nullpunkt) gegen welchen die Ableitelektrode misst, wird hier vom Oszilloskop erfasst.

Station 3: Messung der Ionenpotentialdifferenz

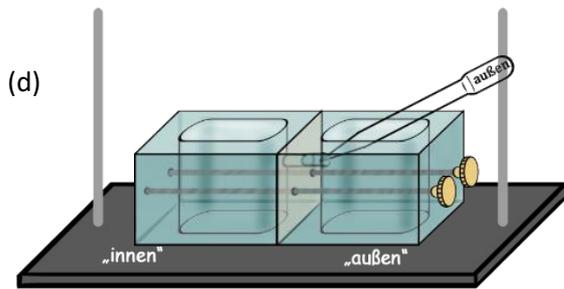
Aufgabe

Zur Messung der Ionenpotentialdifferenz verwenden Sie die bereitgestellte Messapparatur und das Oszilloskop.

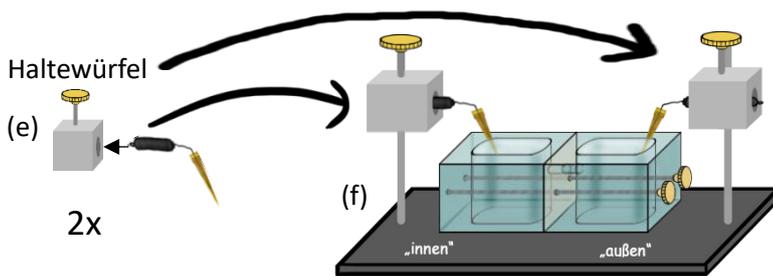
Durchführung



- Setzen Sie die Ionentauschermembran zwischen den Gummidichtungen ein. Die Membran muss das Loch in der Mitte vollständig bedecken.
- Schrauben Sie die Messkammer zusammen **Abb. (a)**.
- Setzen Sie die Messkammer in die Elektrodenhalterung ein **Abb. (b)**.
- Befüllen Sie die Messkammer „innen“ mit 100mM KCl-Lösung. (beschriftete Kunststoffpipette verwenden) **Abb. (c)**.
- Befüllen Sie die Messkammer „außen“ mit der 1mM KCl-Lösung **Abb. (c)**.

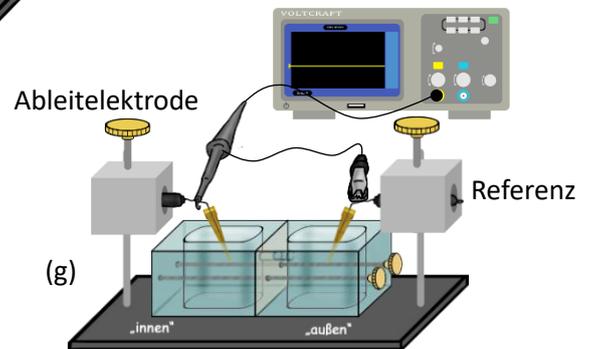


- Entfernen Sie die Luft in dem Kanal zur Ionenaustersmembran mit der kleinen Pipette und der entsprechenden Badlösung **Abb. (d)**.



- Setzen Sie die vorbereiteten Elektroden in die große Öffnung der Haltewürfel ein **Abb. (e)** und befestigen Sie diese an der Elektrodenhalterung **Abb. (f)**.

- Schließen Sie die Apparatur an das Oszilloskop an **Abb. (g)**.

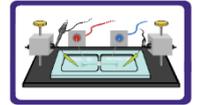


- Entsprechend der nachfolgenden Tabelle werden die Membranpotentiale gemessen. Pipettieren Sie hierzu mit der großen Kunststoffpipette „außen“ die Lösung aus der Kammer „außen“ möglichst rückstandslos heraus in das Abfallbecherglas.

- Die Kammer „außen“ wird nun mit der nächst höher konzentrierten Lösung befüllt (siehe linke Tabelle). Gehen Sie hierbei genau wie zuvor vor.
- Tragen Sie ihre Ergebnisse in nebenstehende Tabelle ein.

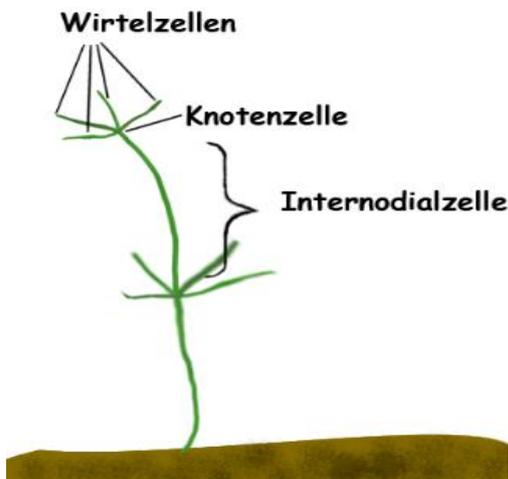
Messergebnisse zur Potentialdifferenz				
KCl-Konzentration außen [mM]	Berechnete Werte [mV] <i>(Bitte übertragen von Station 1; Skript S. 3)</i>		Eigene Messdaten [mV]	
	E _{Kalium}	E _{Chlorid}	E _{Kalium}	E _{Chlorid}
1				
10				
100				
1000				

Hinweis: Wenn mit Station 5 begonnen wird (Venusfliegenfalle), dann in beide Kammern 100mM KCl Lösung füllen und die Elektroden zur Aufbewahrung einhängen, sodass diese nicht austrocknen.



Station 4: Die Kalium–Anästhesiemethode

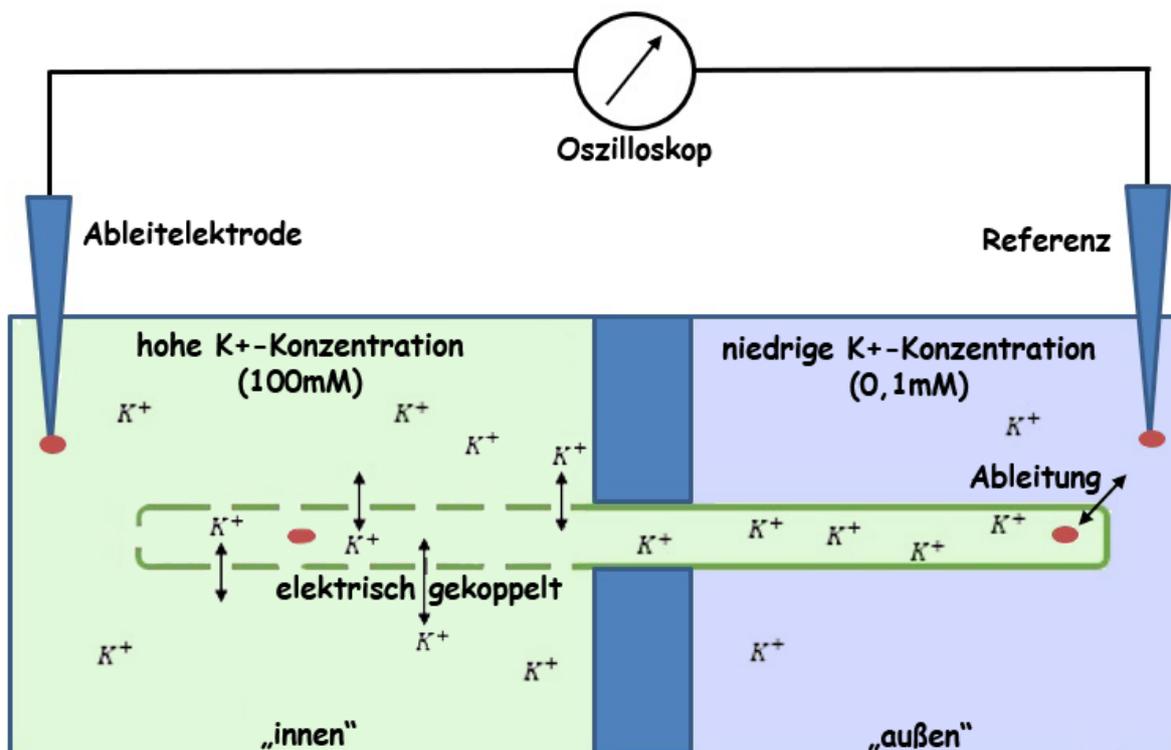
Information zur Armleuchteralge *Chara corallina*

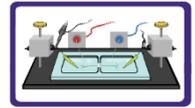


Die Armleuchteralge *Chara corallina* bildet lange Internodialzellen aus, zwischen welchen sich die Knotenzellen mit einem Kranz kurzer Wirtelzellen befinden. Die Internodialzellen können bis zu 10 cm lang werden und eignen sich gut für elektrophysiologische Untersuchungen.

Informationen zur Kalium-Anästhesiemethode

Mit Hilfe der Kalium-Anästhesiemethode gelingt es auf extrazellulärem Weg, intrazelluläre Ableitungen durchzuführen. Die Zellmembran der Internodialzellen von *Chara corallina* weist bei hohen K^+ -Konzentrationen ab ca. 100mM eine sehr hohe Leitfähigkeit für K^+ -Ionen auf. Das Zellinnere wird durch diese Permeabilität mit dem Umgebungsmedium elektrisch gekoppelt. Die Ionenpotentialdifferenz lassen sich mittels Oszilloskop als Spannung über der Zellmembran messen.

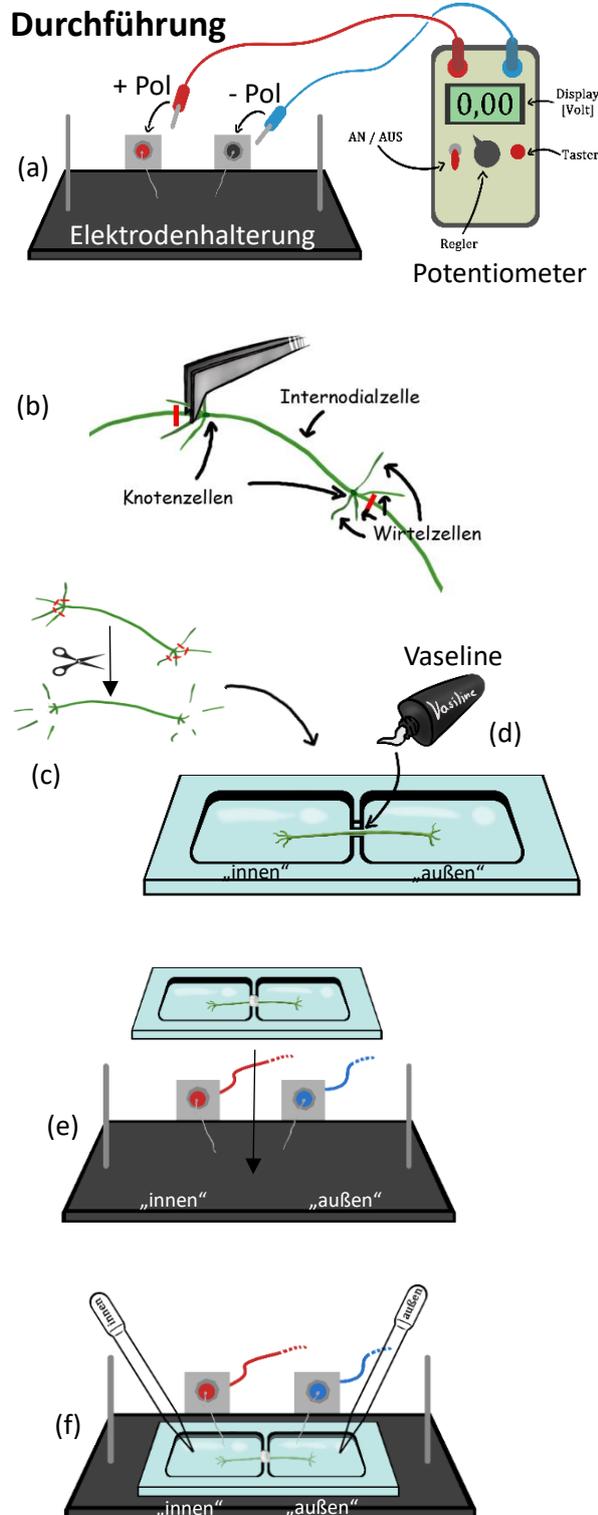




Aufgabe

Präparieren Sie die Internodialzelle einer *Chara corallina*. Depolarisieren Sie anschließend deren Membran mit dem Potentiometer, bis das Schwellenpotential überschritten und ein Aktionspotential (AP) ausgelöst wird.

Durchführung



■ Schließen Sie das Potentiometer an die Elektrodenhalterung an **Abb. (a)**.

■ Verwenden Sie eine intakte Internodialzelle. Diese sollten so wenig wie möglich berührt werden. Achten Sie darauf, dass die Zelle nicht geknickt oder bräunlich verfärbt ist. Lange Zellen sind zu bevorzugen.

■ Schneiden Sie jeweils oberhalb bzw. unterhalb der Knotenzellen den restlichen Teil der Armeleuchteralge ab. Beschädigen Sie die Internodialzelle dabei nicht **Abb. (b)**.

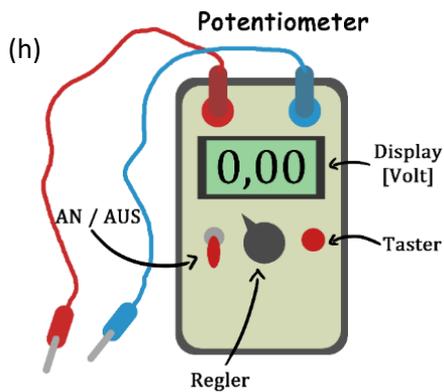
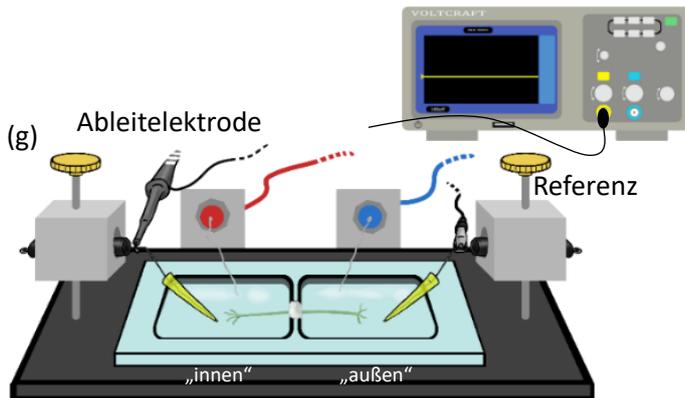
■ Kürzen Sie anschließend die Wirtelzellen mit der kleinen Schere ein **Abb. (c)**.

■ Legen Sie die vorbereitete Internodialzelle in den Spalt und dichten Sie den Spalt mit der Zelle komplett mit Vaseline ab. **Abb. (d)**.

Info: Vaseline ist elektrisch nichtleitend, sodass die beiden Hälften der Kammer isoliert werden. Nur über die Internodialzelle besteht ein Kontakt zwischen den Hälften der Messkammer.

■ Platzieren Sie die so vorbereitete Messkammer in der Elektrodenhalterung **Abb. (e)**.

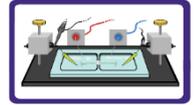
■ Befüllen Sie die linke Hälfte der Messkammer mit Lösung „innen“ (100mM KCl) und die rechte Hälfte der Messkammer mit Lösung „außen“ (0,1mM KCl & 1mM CaCl₂) **Abb. (f)**.



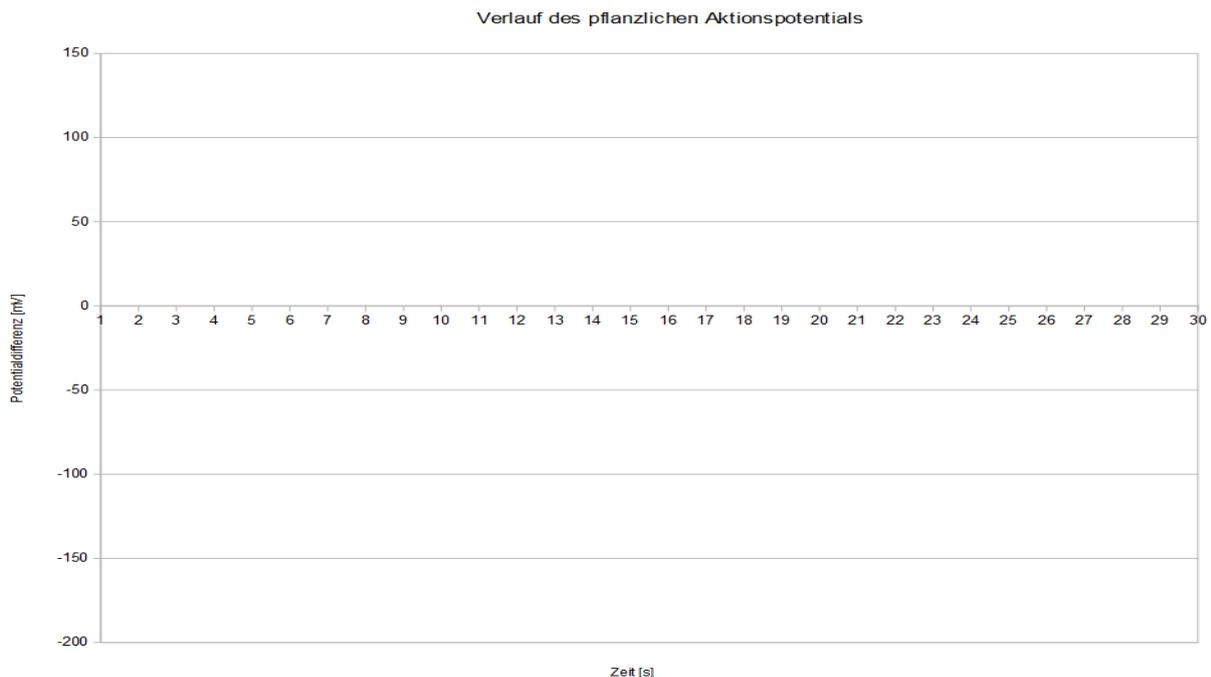
Schwellenpotential: _____ mV
(Bei welchem Membranpotential lässt sich gerade ein AP auslösen?)

Refraktärzeit: _____ sec.
(Nach welcher Zeit ist die Zelle erst wieder erregbar?)

- Schließen Sie das Oszilloskop entsprechend der Abbildung an [Abb. g].
- Stellen Sie die Intervalllänge am Oszilloskop auf 2 Sekunden.
- Messen Sie das Membranruhepotential Ihrer Zelle: mV.
- Schalten Sie das Potentiometer an und stellen mit dem Regler eine Spannung von 0,00 V ein **Abb. (h)**.
- Drücken Sie den Taster am Potentiometer und **halten diesen gedrückt** (3 Sekunden).
- Ist das Schwellenpotential noch nicht erreicht, steigern Sie die Spannung am Potentiometer um 0,01V und wiederholen den Vorgang.
- Wird ein Aktionspotential ausgelöst, pausieren Sie die Anzeige des Oszilloskops und erstellen einen Screenshot auf dem USB-Stick.
- Bestimmen Sie in weiteren Versuchen die **Refraktärzeit** und das **Schwellenpotential**.
- Werten Sie ihre Screenshots am Laptop aus.



Zeichnen Sie den Verlauf des gemessenen Aktionspotentials in das folgende Diagramm ein:





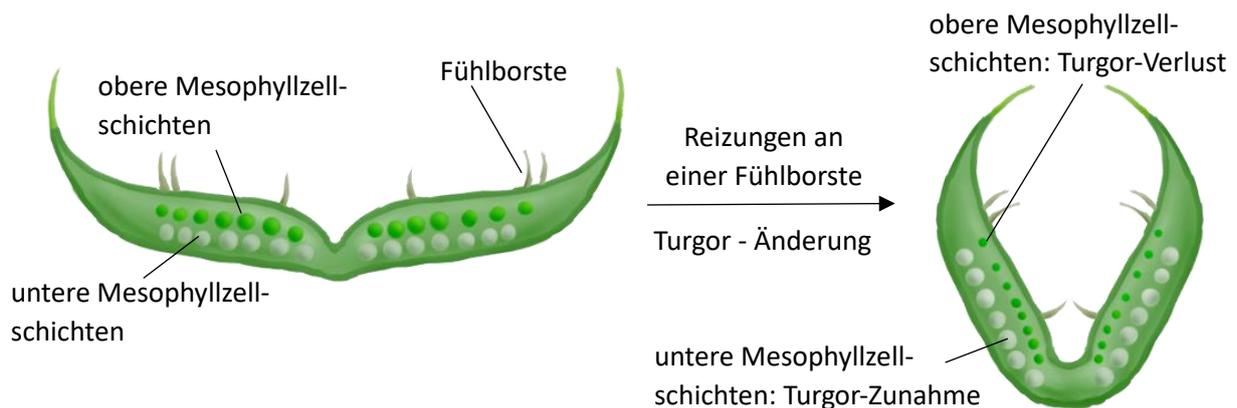
Station 5: Extrazelluläre Ableitung bei der Venusfliegenfalle

Information zum Fangblatt der Venusfliegenfalle

Das Fangblatt der Venusfliegenfalle steht unter mechanischer Spannung. Aktionspotentiale werden durch Reizung der Fühlborsten ausgelöst. Innerhalb von 20 bis 50 Sekunden müssen mehrere Reizungen an den Fühlborsten eines Fangblattes stattfinden, um eine Aufsummierung von Aktionspotentialen über einen bestimmten Schwellenwert zu erreichen. Ist diese Schwelle überschritten, werden in Zellen bestimmter Zellschichten weitere osmotisch aktive Stoffe aus inneren Zellkompartimenten ausgeschüttet. Hierdurch ändert sich der Turgor (Zelldruck) in diesen Zellen, den Mesophyllzellen, sodass sich das Fangblatt schließt.

Achtung: Während des Experimentierens muss zwischen jeder Reizung des Fangblattes immer mindestens eine Minute gewartet werden, um ein frühzeitiges Schließen zu vermeiden! Dies gilt auch für Einstiche in das Fangblatt!

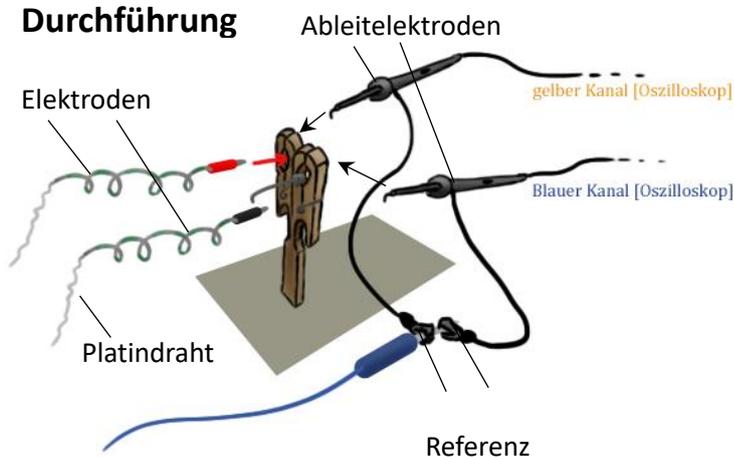
Fangmechanismus der Venusfliegenfalle



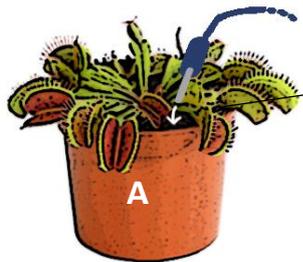
Aufgabe

Zeigen Sie, dass der Fangmechanismus durch Aufsummierung von Aktionspotentialen ausgelöst wurde.

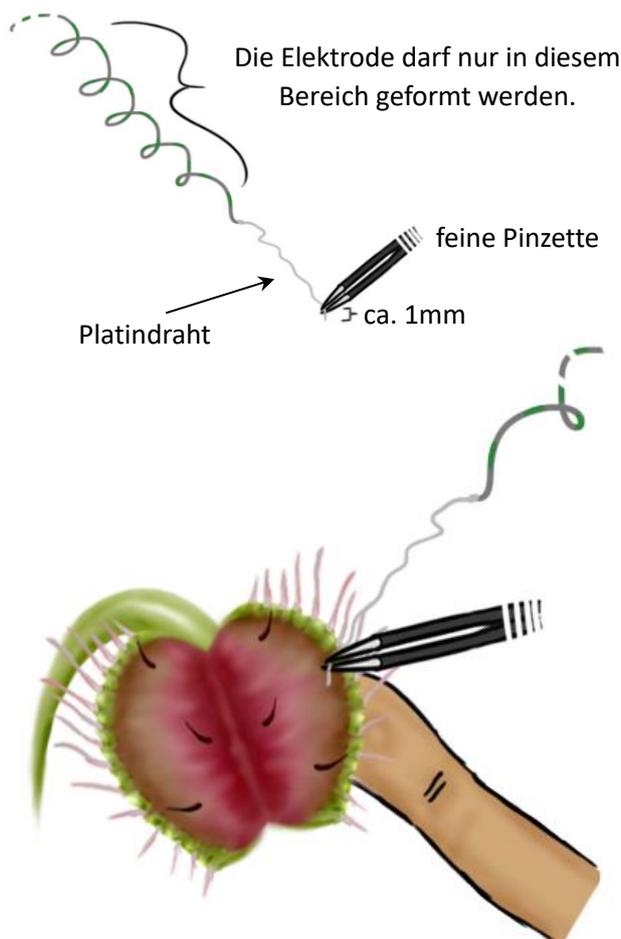
Durchführung



- Schließen Sie die Apparatur entsprechend der Abbildung an.



Info: Das Substrat („Erde“) der Venusfliegenfalle besteht zum Großteil aus Weißtorf.



Mit dem Finger Gegendruck von hinten auf das Fangblatt ausüben.

- Stecken Sie das andere Ende des blauen Kabels in das Substrat Ihrer Pflanze.
- Suchen Sie sich ein weit geöffnetes, gesundes und gut erreichbares Fangblatt aus (Abb. A).
- Formen (biegen/strecken/stauchen) Sie sich ihre Elektrode so zurecht, dass diese in das ausgewählte Fangblatt eingestochen werden kann. **Achtung: Platindraht nicht abreißen!**

Achtung: Die Elektrode darf nur in dem links gekennzeichneten Bereich geformt werden!

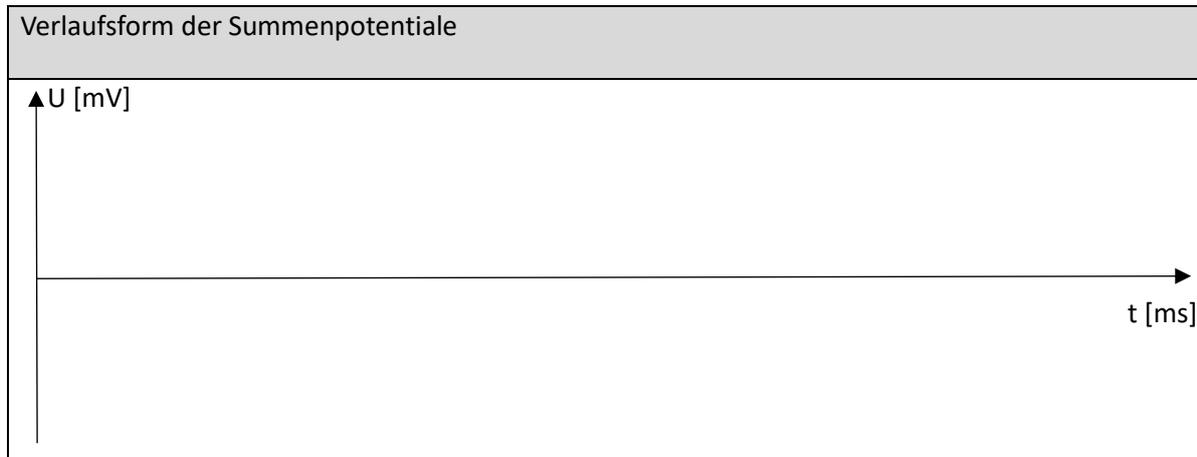
- Stechen Sie das Ende der Platinelektrode mit Hilfe der feinen (schwarzen) Pinzette am Rand des Fangblattes ein.
- Schalten Sie das Oszilloskop ein.
- Stellen Sie die Intervalllänge am Oszilloskop auf 400ms.
- Tragen sie ihre gemessene Spannung in die Tabelle ein.
- Berühren sie mit der Präpariernadel eine Fühlborste. So lösen sie eine Spannungsänderung aus. Warten sie anschließend eine Minute und wiederholen Sie die Reizung diesmal, indem sie die Fühlborste zweimal hintereinander berühren.
- Erstellen Sie nach den jeweiligen Reizungen einen Screenshot auf dem USB-Stick und werten diese anschließend am Laptop aus.
- Tragen Sie ihre Messdaten ein und zeichnen Sie die Aufsummierung der Spannungsänderungen in die Grafik auf der nächsten Seite ein.

Tragen Sie ihre Messdaten ein:

Gemessene Spannung zu Beginn [mV]:	
Spannung der maximalen Amplitude der ersten Depolarisierung [mV]:	
Spannung der maximalen Amplitude des zweiten Aktionspotentials [mV]:	

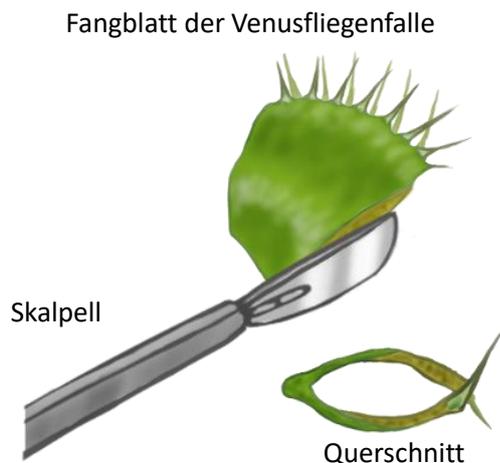


Zeichnen Sie den Verlauf ihrer Messung ein:



Aufgabe

Betrachten Sie wie sich ein Querschnittspräparat eines Fangblattes der Venusfliegenfalle in unterschiedlich osmolaren Lösungen verhält.



- Füllen Sie die 1M KCl-Lösung in die gekennzeichnete Petrischale.
- Füllen Sie entsprechend das VE-Wasser (vollentsalztes Wasser) in die gekennzeichnete Petrischale.
- Erstellen Sie einen Querschnitt eines Fangblattes, indem Sie mit dem Skalpell einen 1mm breiten Streifen entsprechend der Abbildung links abschneiden. Nutzen Sie hierfür als Unterlage die Glasschale.
- Legen Sie diesen Querschnitt in die Petrischale mit der 1M KCl-Lösung.
- Notieren Sie die Veränderung nach 5min:

Beginnen Sie in der Zwischenzeit mit der Messung zur Ausbreitungsgeschwindigkeit!

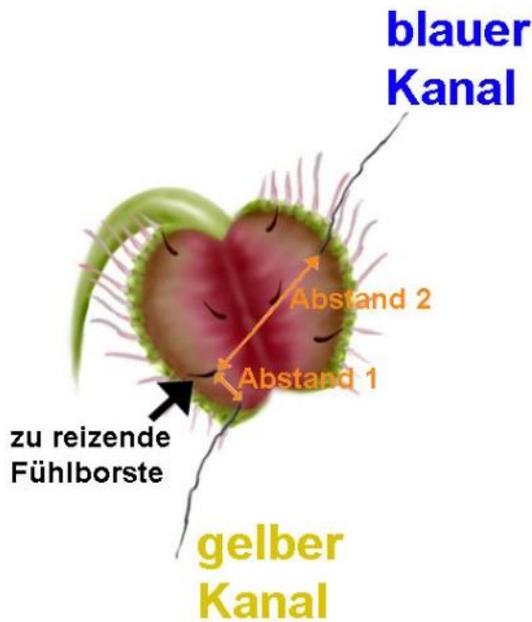
- Nach weiteren 5min entnehmen Sie den Querschnitt mit einer Pinzette und legen ihn in die Petrischale mit VE-Wasser. Beobachten und dokumentieren Sie auch hier die Veränderung nach 5min.



Aufgabe

Berechnen Sie die Ausbreitungsgeschwindigkeit eines Aktionspotentials.

Durchführung



- Stechen Sie zwei Platinelektroden in ein Fangblatt der Venusfliegenfalle ein. Verfahren Sie hierzu wie zu Beginn der **Station 5** (S. 11/12).

Achtung: Zwischen jedem Einstichversuch muss mindestens eine Minute gewartet werden!
Berühren Sie hierbei nicht die Fühlborsten!
Die Platinelektrode darf nur an der Einstichstelle Kontakt zur Pflanze haben!
Die beiden Platinelektroden dürfen sich nicht berühren!

- Suchen Sie sich eine Fühlborste aus, welche einen möglichst unterschiedlich großen Abstand zu den eingestochenen Elektroden hat.
- Messen Sie die jeweiligen Abstände mit dem Lineal:

Abstand 1: Fühlborste zu Platinelektrode des gelben Kanals [mm]:	
Abstand 2: Fühlborste zu Platinelektrode des blauen Kanals [mm]:	

Berechnung der Ausbreitungsgeschwindigkeit:

Zur Berechnung der Ausbreitungsgeschwindigkeit wird neben der räumlichen Differenz ($s_{Diff} = \text{Betrag der Abstandsdifferenz der Elektroden zur Fühlborste}$) auch die zeitliche Differenz (t_{Diff}) der beiden Amplitudenmaxima benötigt. Diese lässt auf dem Screenshot anhand der Intervalllänge ablesen.

Es ergibt sich folgende Formel:

$$v = \frac{s_{Diff}}{t_{Diff}} = \frac{|(\text{Abstand 2}) - (\text{Abstand 1})| \text{ [mm]}}{t_{Diff} \text{ [ms]}}$$

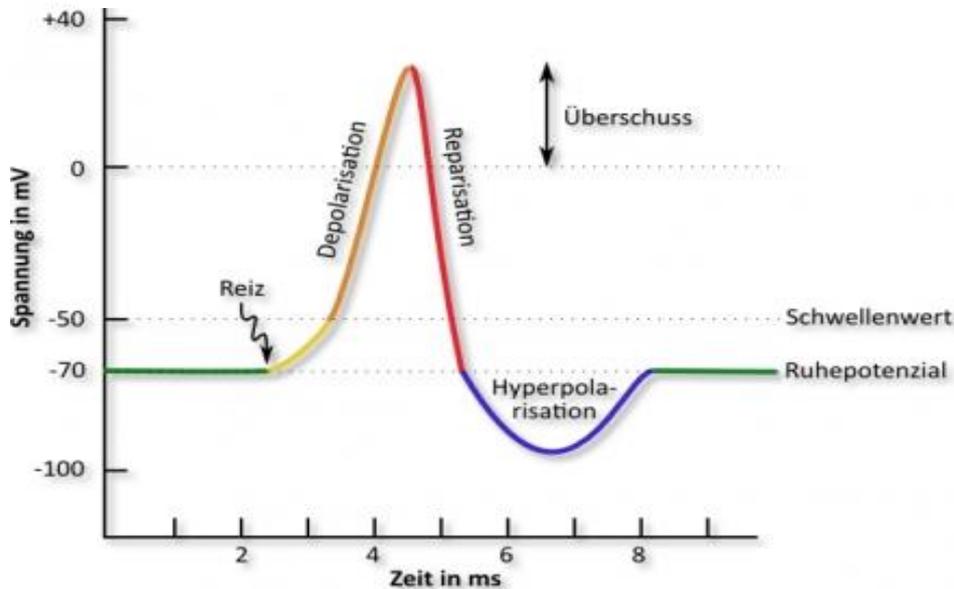
Hier entsprechend einsetzen:

$$v = \frac{\boxed{} \text{ [mm]}}{\boxed{} \text{ [ms]}} = \boxed{} \frac{\text{mm}}{\text{ms}} = \frac{\text{m}}{\text{s}} \hat{=} \boxed{} \frac{\text{cm}}{\text{s}}$$

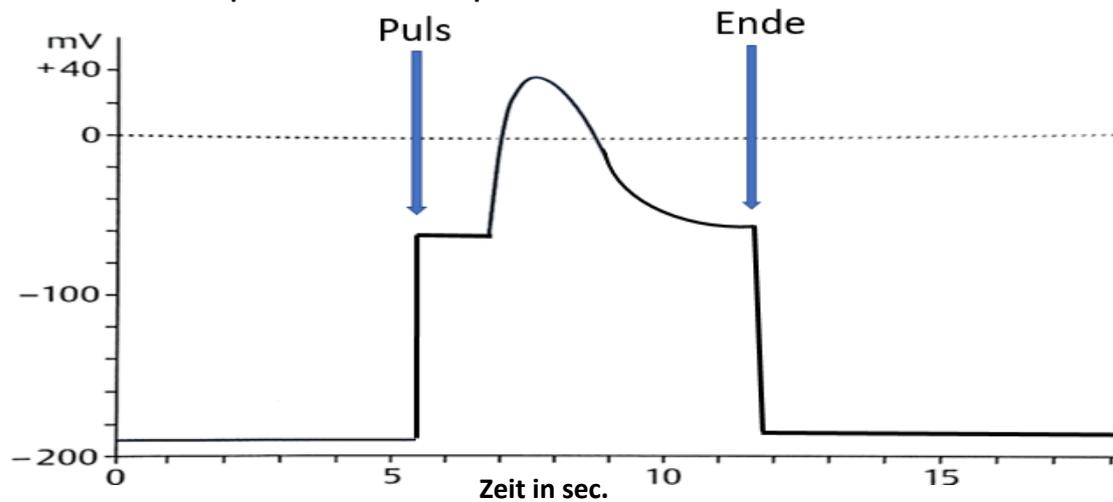


Station 6: Ergebnisbesprechung

Verlauf neuronales Aktionspotential



Verlauf pflanzliches Aktionspotential



Merkmal	Neuron	Pflanze
E_m [mV]		
AP-Dauer		
AP-Amplitude [mV]		
Schwellenpotential [mV]		
Refraktärzeit		
Welches Ion bestimmt das E_m		
Welches Ion verursacht die Depolarisation beim AP		
Welches Ion verursacht die Repolarisation beim AP		

Vergleichen Sie pflanzliches und neuronales Ruhepotential und Aktionspotential:

Merck - TU Darmstadt

Lernlabor **Biologie**

Name:

Schule:

Gruppe:

Anmeldung unter:

lernlabor@bio.tu-darmstadt.de

Homepage:

<https://www.biolernlabtudarmstadt.de>