

Mikroinjektion in Pflanzenzellen etiolierter Keimlinge mit Hilfe des Eppendorf InjectMan® 4

TIM KUNKEL, FAKULTÄT FÜR BIOLOGIE, ALBERT-LUDWIGS-UNIVERSITÄT FREIBURG

Zusammenfassung

Für zahlreiche Modellsysteme stellt die Mikroinjektion eine etablierte Methode zur Einführung von DNA in Einzelzellen dar, um sowohl transiente als auch stabile Transformatanten zu erzeugen. Es können nicht nur Nukleinsäuren, sondern auch Proteine und kleinere Effektoren injiziert werden. Die Injektion von Pflanzen ist jedoch besonders anspruchsvoll, und nur ein geringer Anteil der injizierten Zellen überlebt. Die Effizienz hängt hauptsächlich von den verwendeten Geräten sowie von den Injektionsbedingungen ab. Für diese Application Note wurde das neue Eppendorf-Mikromanipulationssystem eingesetzt, um Keimlinge der Tomate, des Senfs und der *Arabidopsis* zu injizieren. Injektionen von Lucifer-yellow-Farbstoff (ly) und Alexa-Fluor®-488-markiertem Histon-Protein (Histon-AF488) führten zu einer Überlebensrate von ca. 25 % aller Zellen 24 h nach der Injektion. Das neue Eppendorf-Mikromanipulationssystem mit seinen außerordentlich schnellen und präzisen Motorbewegungen ist demnach sehr gut für die Injektion von Pflanzenzellen geeignet.

Einleitung

Die Mikroinjektion „höherer“ Pflanzenzellen wurde vor einigen Jahren von Chua und Mitarbeitern eingesetzt, um Reaktionen auf die Lichtsignalkaskade zu untersuchen [1]. In diesen Untersuchungen konnten zelluläre Antworten wie z.B. die Entwicklung von Plastiden und die Produktion von Anthocyanin nach Injektion des Rot-/Dunkelrot-Photorezeptors Phytochrom A beobachtet werden. Normalerweise verfügen Pflanzen über sehr starre Zellwände, was die Mikroinjektion erschwert, und daher stabile Injektionskapillaren mit geringem Durchmesser erforderlich macht. Das Zytoplasma, das die große zentrale Vakuole umgibt, ist nur wenige µm dick. Durch die Deformation der Zellwand während der Injektion und die plötzliche Entspannung in dem Moment, in dem die Kapillare die Wand durchdrungen hat, befindet sich die Nadel am Ende häufig in der Vakuole. Material, welches in die Vakuole injiziert wird, ist dort nicht nur gefangen, sondern kann aufgrund des

niedrigen pH-Wertes innerhalb der Vakuole sowie durch die Aktivität mehrerer Proteasen abgebaut werden. Hinzu kommt, dass unter dem Mikroskop die optischen Eigenschaften intakter Pflanzenkeimlinge oder -organe aufgrund von mehrlagigen Zellschichten, der Lichtbrechung und der Pigmentierung nicht optimal sind. Daher ist es oft sehr schwierig, einzelne Zellschichten oder sogar subzelluläre Strukturen wie Vakuolen während des Mikroinjektionsprozesses unter mikroskopischer Kontrolle zu identifizieren. Um einige der oben beschriebenen Probleme anzugehen, hat Eppendorf ein Mikromanipulationssystem entwickelt, welches mit außerordentlich schnellen Mikromotoren, variablen Injektionsparametern sowie hohem Halte- und Injektionsdruck ausgestattet ist und zusätzlich eine neu entwickelte Piezo-Schrittfunktion besitzt.

Das unten beschriebene Setup wurde erfolgreich auf die Eignung zur Injektion von Pflanzenzellen getestet.

Methoden

Vorbereitung

Keimlinge wurden auf nasses Filterpapier platziert und nach der Keimung über verschiedene Zeiträume in kontinuierlicher

Dunkelheit (dD) inkubiert (*Sinapis alba* 4 dD, *Lycopersicon esculentum* 6 dD, *Arabidopsis thaliana* 4 dD). Das Keimen von *Arabidopsis*-Keimlingen wurde durch eine 2-tägige Kältebehandlung (4 °C) und nachfolgende Bestrahlung mit weißem Licht über einen Zeitraum von 6 h induziert. Die Mikroinjektion wurde in einer speziell gefertigten sterilen Werkbank auf einer Arbeitsbank aus Stein durchgeführt, um die Vibrationen des Ventilators zu blockieren.

Mikroinjektion

Der Arbeitsplatz zur Mikroinjektion stellte sich wie folgt zusammen: Der Eppendorf-Mikromanipulator InjectMan 4 wurde auf ein Zeiss® Axiovert® 135 inverses Mikroskop adaptiert. Der Piezo-Aktuator des Eppendorf PiezoXpert® wurde in einem Winkel von 35° auf die Motoren des InjectMan 4 montiert, und dessen Steuerungseinheit wurde elektronisch mit dem InjectMan 4 verbunden, um synchronisierte Piezo-unterstützte Injektionsschritte zu ermöglichen. Die Parameter des Injektionsdruckes wurden mit Hilfe des Eppendorf FemtoJet® festgelegt. Die Injektionsparameter sind in Tabelle 1 aufgeführt. Der Injektionsdruck wurde nach erfolgreicher Penetration der Zellwand ausgelöst. Der Gesamtaufbau ist in Abb.1 gezeigt.

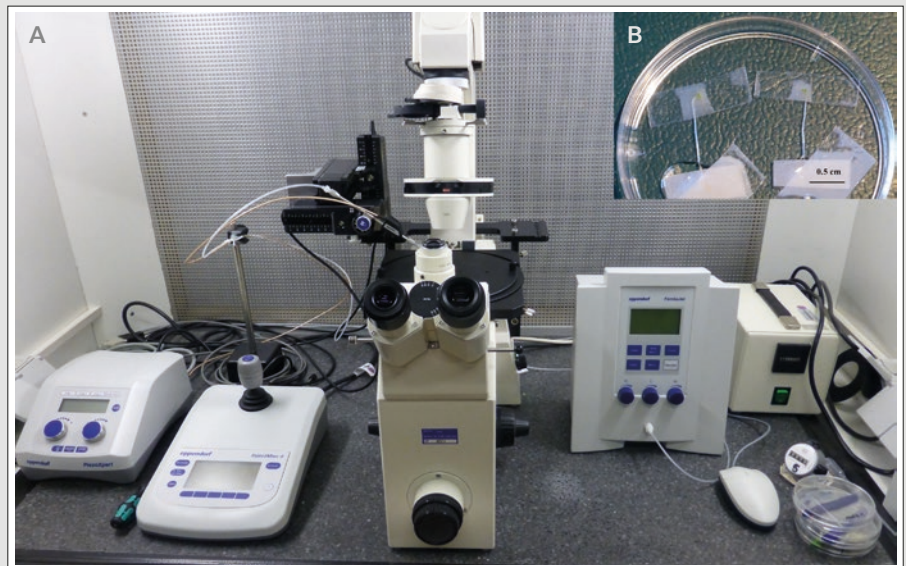


Abb. 1: Überblick über den Aufbau des Mikroinjektions-Arbeitsplatzes (A) und Fixierung der etiolierten *Arabidopsis*-Keimlinge (B). (A) Von links nach rechts: Eppendorf PiezoXpert-Steuerungseinheit mit auf die InjectMan-Motoren montiertem Piezo-Aktuator, Eppendorf InjectMan 4 mit Mikromotoren, adaptiert auf ein inverses Mikroskop, Eppendorf FemtoJet. (B) Keimlinge wurden mit Klebeband auf dem Deckel einer Petrischale fixiert; die Wurzeln wurden mit feuchtem Filterpapier bedeckt.

Mikroinjektion in Pflanzenzellen etiolierter Keimlinge mit Hilfe des Eppendorf InjectMan® 4

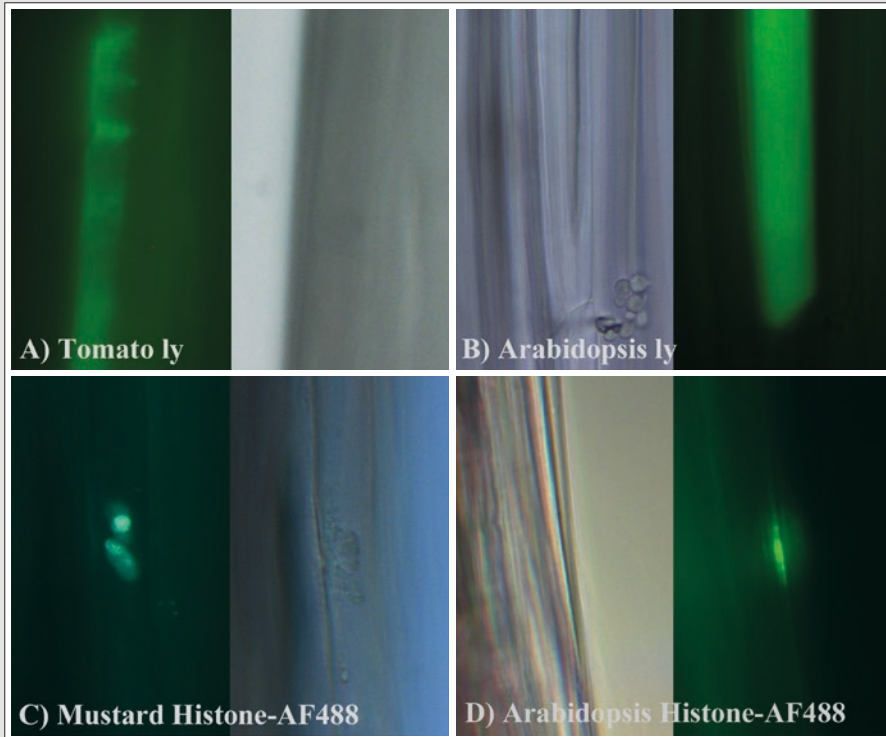


Abb. 2: Fluoreszenzanalysen 24 h nach der Injektion etiolierter Keimlinge von Tomate (A), *Arabidopsis* (B, D) und Senf (C). Lucifer yellow (ly); Alexa-Fluor-488-markiertes Histon (Histon-AF488)

Keimling	Einstellung der Injektionsparameter Pi (hPa)	Ti (s)	Pc (hPa)	Kapillaröffnung µm	Injizierte Lösung	Injizierte Zellen Anzahl	Positive Zellen % (Anzahl)
Senf	2.000	0,2	800	0,8	ly	27	26 % (7)
Tomate	2.400	0,3–0,6	1.200	0,2–0,5	ly	25	48 % (12)
<i>Arabidopsis</i>	2.400	0,6	840	0,2–0,5	ly	34	11 % (4)
Senf	2.400	0,5	1.200	0,3–0,4	Histon	43	23 % (10)
<i>Arabidopsis</i>	2.400	0,5	1.000	0,3–0,4	Histon	15	26 % (4)

Tabelle 1: Mikroinjektion von Lucifer yellow (ly) und Alexa-Fluor-488-markiertem Histon (Histon) in etiolierte Keimlinge der Tomate, des Senfs und der *Arabidopsis*. Haltedruck vor der Injektion (Pc), Injektionsdruck (Pi), Injektionszeit (Ti).

Ergebnisse und Diskussion

Der Injektionswinkel wurde auf 35° eingestellt, und axiale Injektionsbewegungen wurden bei einer Geschwindigkeit von 3.000 µm/s mit einer Schrittgröße von 10–20 µm durchgeführt. Diese Parameter sorgen für eine minimale Verletzung der Zellwand und somit wahrscheinlich für eine erhöhte Überlebensrate nach der Injektion. Als Kennzeichen für die Injektion wurde Lucifer yellow eingesetzt, ein wasserlöslicher Farbstoff, welcher eine einfache Unterscheidung zwischen Fluoreszenz im Zytoplasma bzw. in der Vakuole erlaubt. Die Injektion erfolgte wie in Tabelle 1 dargestellt. Die Analyse wurde 24 h nach der Injektion mit Hilfe eines Zeiss YFP- oder GFP-Fluoreszenzfiltersets durchgeführt. Für diese Untersuchungen wurden Keimlinge der

Tomate, des Senfs und der *Arabidopsis* verwendet. Im Falle der Tomaten- und der Senf-Keimlinge konnten Injektionseffizienzen von 26 % bzw. 48 % erzielt werden (Abb. 2).

Die Injektionseffizienz für *Arabidopsis*-Keimlinge lag nach 24 h bei etwa 10 %. Im Vergleich zu Tomaten- und Senf-Keimlingen ist die Injektionseffizienz bei *Arabidopsis*-Keimlingen stark herabgesetzt. Allerdings sind diese Keimlinge wesentlich kleiner und sehr zart. Daher sterben nicht nur relativ häufig die injizierten Zellen ab, sondern in vielen Fällen ist das gesamte Hypocotyl betroffen. In Anbetracht dieser Herausforderungen stellt eine Injektionseffizienz von 10 % nach unserer Meinung einen guten Wert für *Arabidopsis*-Keimlinge dar. Lokal begrenzte Fluoreszenz von

Lucifer yellow 24 h nach der Injektion war ein Zeichen der Lebensfähigkeit der Zellen; allerdings ist ly kein *in vivo* Marker. Aus diesem Grund entschieden wir uns, eine zytoplasmatische Injektion mit Alexa-Fluor-488-markiertem Histon (Histon-AF488) durchzuführen, denn ein Transport von Histon-AF488 in den Zellkern kann nur in lebenden Zellen erfolgen [2].

Wie in Tabelle 1 aufgeführt, lag der prozentuale Anteil der Zellen, welche Histon-AF488-Fluoreszenz im Zellkern zeigten, in der Größenordnung des Anteils, der nach ly-Injektion beobachtet wurde, was bestätigte, dass diese Zellen den Injektionsvorgang überlebt hatten. Aus diesen Ergebnissen kann geschlossen werden, dass das neue Eppendorf-Mikromanipulationssystem mit seinen außerordentlich schnellen und präzisen Motorbewegungen hervorragend für die Injektion von Pflanzenzellen geeignet ist. Dies schließt die Injektion von *Arabidopsis*-Keimlingen mit einer relativ hohen Effizienz ein.

Da eine umfangreiche Sammlung von *Arabidopsis*-Mutanten und transgenen Linien für zahlreiche Forschungsgebiete zur Verfügung steht, sollte die Mikroinjektion von *Arabidopsis*-Zellen aus spezifischen Organen und Geweben, neben der Injektion anderer Pflanzenspezies, bei der Analyse einer Vielzahl wissenschaftlicher Fragestellungen behilflich sein.

Danksagung

Ich danke Dr. Stefan Kircher und Prof. Eberhard Schäfer für ihre Unterstützung und wissenschaftliche Diskussionen.

Literatur

[1] Neuhaus G, Bowler C, Kern R, Chua NH. Calcium/Calmodulin-dependent and -independent phytochrome signal transduction pathways. *Cell* 1993; 73:937-952.

[2] Melchior F, Paschal B, Evans J and Gerace L. Inhibition of nuclear protein import by nonhydrolyzable analogues of GTP and identification of the small GTPase Ran/TC4 as an essential transport factor. *J Cell Biol* 1993; 123:1649-1659.

Die vollständige Version dieser Application Note (Nr. 346) kann auf www.eppendorf.de/application als PDF-Datei heruntergeladen werden.

Leserservice

Familienprospekt „Smooth Operator“
(neue Mikromanipulatoren) • Kennziffer 266