

Kurzreferenz: Mitochondrien in Fluoreszenz

Dipl.-Phys. Thilo Bauer
Heimerzheimer Str. 2, 53332 Bornheim
eMail: tbauer@microinformatics.net

Copyright © 2016. Nachdruck und Vervielfältigung nur mit schriftlicher Genehmigung des Verfassers.

Filtersätze für Mitochondrien

Die meisten Fluorochrome, welche für Mitochondrien geeignet sind, fluoreszieren vorwiegend grün. Eine Ausnahme bildet MitoTracker Red, welcher eine Grünanregung benötigt.

Der Standard-Filterwürfel für Blauanregung besitzt eine Anregung mit der Mittenwellenlänge 470 nm. Die Emission wird mit einem Langpassfilter beobachtet welcher etwa bei 510 nm öffnet (Beispiel: Zeiss Filtersatz 09, vgl. Abb 1).

Für Mehrfachfärbung ist eine UV Anregung erforderlich. Meist werden blau fluoreszierende Kernfarbstoffe eingesetzt, aber auch Brightener zur Färbung von Zellwänden (z.B. Hefen). Kernfarbstoffe sind vorzugsweise die Hoechst Farbstoffe (33258, 33342 und 34580), aber auch DAPI, Ethidiumbromid. Brightener wie Uvitex 2B, Calcofluor White oder Mykoval färben Chitin bei der Pilzfärbung und Zellulose. Typischerweise besitzen die Filtersätze eine Anregung um 365 nm, 370-390 nm.

Gelegentlich wird in der Literatur meist ein sogenannter Rhodamin Filtersatz empfohlen. Für die beiden Fluorochrome Rhodamin 6G und Rhodamin 123 ist ein Rhodamin Filtersatz ungeeignet, da für beide Fluorochrome eine Blauanregung erforderlich ist!

Multi-Band-Filter

Für Spezialanwendungen lassen sich auch gleichzeitige Anregung mit mehreren Wellenlängen und Fluorochromen realisieren. Der Filtersatz F66-L422 der Firma AHF beispielsweise besitzt drei Anregungs-Bänder bei 375 nm, 470 nm bzw. 585 nm. Die nebenliegend ausgeführten Emissions-Banden erlaubt die gleichzeitige farbige Beobachtung mit UV, Blauanregung und Grünanregung. Der Filtersatz ermöglicht u.a. auch die Fluorochromierung von Algen und Pflanzenpräparaten, da er aufgrund der geblockten Wellenlängen seiner Emissions-Banden, die helle Autofluoreszenz des Chlorophylls stark unterdrückt.

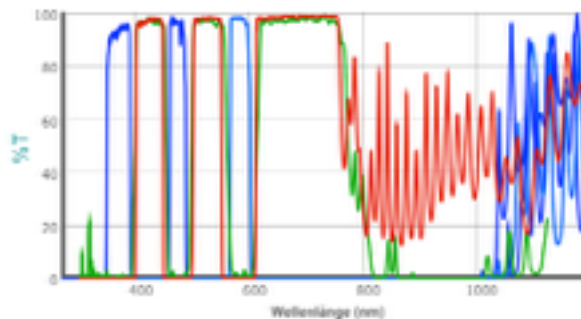


Abb 3: Tripelband-Filtersatz F66-L422 (AHF) bietet UV-, Blau und Grün-Anregung und unterdrückt wirkungsvoll die Autofluoreszenz des pflanzlichen Chlorophylls.

Benötigte Materialien

Für die Fluoreszenzmikroskopie werden folgende Hilfsmittel benötigt:

- Kleine, digitale Waage mit Auflösung +/-1 mg zum Ansetzen von Farbstofflösungen
- Einstellbare Mikroliter-Pipetten in den Größen 2-20 μ l, 20-200 μ l und 100-1000 μ l
- Vorrat an Pipettenspitzen für die genannten Pipetten (in 1000er Gebinden zu erwerben)
- Erlenmeyerkolben 100 ml
- Bechergläser 50 ml
- Vorrat an Reaktionsgefäßen 1,5 ml zum Ansatz von Gebrauchslösungen und Färbungen
- Optional: Mikrozentrifuge mit Einsätzen für Reaktionsgefäße 1,5 ml (z.B. Eppendorf)
- Glasflaschen zur Aufbewahrung von Farbstoff-Lösungen (Braunglas)
- Verschließbarer, lichtdichter Schrank zur Lagerung von Fluorochromen

- Optional: kleiner Kühlschrank mit Gefrierfach zur Aufbewahrung von speziellen Fluorochromen
- Nitrilhandschuhe in passender Größe
- Objektträger in ausreichender Zahl, mit oder ohne mattierte Schriftfläche
- Deckgläser mit Normdicke 0,17 mm
- Präparier- bzw. Mikroskopierbesteck (Pinzetten, Schere, Präpariernadeln, Skalpell)
- Uhrgläser oder kleine Petrischalen \varnothing 5-6 cm
- Wasserfester Stift zum Beschriften von Präparaten



Abb: Reaktionsgefäß



Abb.: Mikroliter-Pipette

Farbstoffe für Mitochondrien

Die folgende Tabelle stellt eine kleine Auswahl von Fluorochromen dar, die für die Mitochondrien Färbung verwendet werden. Einige Fluorochrome bewirken eine mehr oder weniger spezifische Färbung.

Farbstoff	Hellfeld	Fluoreszenz	Wirkung
Anilin Fuchsin	+		siehe L. Michaelis, siehe auch Säurefuchsin
Brilliantkresylblau	+	+	widersprüchliche Literaturangaben
DiOC DiSC		+	Carbocyaningruppe DiRC _x (3) mit O, S, oder I = C(CH
DiOC		+	konzentrationsabhängig, Mitochondrien und ER
Eisenhämatoxylin	+		Zellkern, Mitochondrien, Plasma (unspezifisch)
Janusgrün B	+		Reduktion von Hydrogenase, färbt auch DNA
MitoTracker Green		+	spezifisch, proprietäre Verbindung
MitoTracker Red		+	spezifisch, proprietäre Verbindung
Pyronin Y		+	RNA, Mitochondrien
Rhodamin B		+	unsicher, lipophiler Charakter
Rhodamin 6G		+	spezifisch, Membranpotential, Mitochondrien und ER
Rhodamin 123		+	spezifisch, Membranpotential
Säurefuchsin	+		nach Altmann, Mitochondrien und Zellkern

Protokoll 1: Mitochondrien in Zwiebelzellen

Diese Färbung benötigt ein Fluoreszenzmikroskop mit Blauanregung (470 nm) und blauer Beleuchtung (z.B. LED 470 nm) voraus.

Stammlösung: 10 mg Rhodamin 6G werden in 50 ml Aqua dest. gelöst. Die Lösung sollte zur guten Durchmischung wenigstens einen Tag stehen. Die Lösung wird in einer braunen Glasflasche im Dunkeln aufbewahrt und ist lange haltbar.

Gebrauchslösung: Für die Färbung von Zellen wird die Stammlösung 1:20 bis 1:100 mit Aqua. dest. zu einer Gebrauchslösung (4-20 μ M) verdünnt. Die Färbelösung wird aliquotiert in 1,5 ml Reaktionsgefäßen an die Schüler verteilt.

Färbung: Nacheinander werden 5 μ l der Gebrauchslösung und 25 μ l Leitungswasser auf einen Objektträger gegeben. Ein Stück Zwiebelhaut wird aus einer frischen Biozwiebel geschnitten, in die Lösung eingelegt und ein Deckglas aufgelegt. Lufteinschlüsse sind ggf. erlaubt. Nach einer Färbedauer von wenigstens 10-30 Minuten erfolgt das Waschen der Probe wie folgt: Die Färbelösung wird mit einem Stück Löschpapier am Deckglasrand abgesaugt. Am gegenüberliegenden Deckglasrand wird anschließend ein neuer Tropfen von 10-20 μ l Wasser angesetzt. Nach 5 Minuten wird erneut abgezogen. Die Prozedur wird dreimal wiederholt. Mit dem Fluoreszenzlicht sollte nun kein oder nur ein schwacher grüner Hintergrund erkennbar sein.

Projekte: Zellen der Zwiebelepidermis sind ein dankbares Studienobjekt mit geringem Risiko. Hier lassen sich die Mitochondrien mit Rhodamin 6G oder Rhodamin 123 gut färben und ihre Wanderung entlang der Filamente und Microtubuli beobachten. Die Färbung mit Rhodamin 6G oder Rhodamin 123 bietet damit ein weites Experimentierfeld. So gibt es zahlreiche Literatur zu Wechselwirkungen mit Drogen und Antioxidantien, beispielsweise aus Extrakten von schwarzem Tee oder Oolong Tee.

Protokoll 2: Gegenfärbung von Zellwänden mit Uvitex 2B

Hefezellen, Proben mit Pilzfäden und Schimmel

Diese Färbung benötigt ein Fluoreszenzmikroskop mit UV Anregung und Blauanregung (470 nm) mit den jeweiligen Filtersätzen und Beleuchtungseinrichtungen voraus. Die UV Anregung erfolgt ideal mit einem Filtersatz mit Mittenwellenlängen zwischen 350 nm (z.B. Zeiss Filtersatz 01) oder 380 nm besitzen.

Gebrauchslösung: 5 mg Uvitex 2B werden in 50 ml Aqua dest. gelöst. Die Lösung sollte zum guten Durchmischen wenigstens einen Tag stehen. Die Lösung wird in einer braunen Glasflasche im Dunkeln aufbewahrt und ist lange haltbar. Die Lösung wird unverdünnt aliquotiert in 1,5 ml Reaktionsgefäßen und an die Schüler verteilt.

Färbung: Nacheinander werden 5 μ l der Uvitex-Lösung, 5 μ l der Rhodamin Gebrauchslösung aus Protokoll 1 sowie 25 μ l der Probe auf einen Objektträger getropft, vorsichtig vermischt und ein Deckglas aufgelegt. Nach einer Färbedauer von 5-10 Minuten kann mit der mikroskopischen Beobachtung begonnen werden.

Resultat: Die Fluoreszenz des gefärbten Chitin fällt intensiv blau aus, die Fluoreszenz der Mitochondrien grün. Die Färbung vermittelt einen Eindruck von der räumlichen Zellwand in der die Mitochondrien eingeschlossen sind.

Uvitex 2B ist ein optischer Aufheller und gehört zur Gruppe der Stilbene. Der Farbstoff wird zum Nachweis von Chitinen und Zellulose genutzt. In den Proben färbt es unter anderem die Zellwände von Pilzen, Hefezellen und manchen Algen. Alternative Farbstoffe sind Mycoval, Calcofluor White, Tinopal LBW. Da die optischen Aufheller unspezifisch wirken, ist eine preiswerte, technische Qualität der Farbstoffe völlig ausreichend. Die Literatur gibt für Uvitex 2B gegenüber Calcofluor White eine geringere Neigung zum Photobleaching an (Wachsmuth, 1988).

Bezugsquellen

Anbieter für den Eigenbedarf und wissenschaftlichen Laborbedarf, die auch Zertifikate herausgeben:

- Omikron, Dr. Birgit Henrichfreise, <http://www.omikron-online.de>, preiswerte Fluorochrome, allgemeiner Laborbedarf
- PromoCell, <http://www.promokine.info>, liefert sowohl Fluorochrome, als auch Agenzien für Zellkultur
- Carl Roth, <https://www.carlroth.com>, Fluorochrome, Chemikalien
- Sigma-Aldrich: <http://www.sigmaaldrich.com>, häufig zitierte Quelle für Fluorochrome, Zellkultur und allgemeine Chemikalien.
- Thermo Fisher Scientific, <https://www.thermofisher.com>, vereint häufig zitierte Anbieter, wie Molecular Probes und Invitrogen und bietet vor allem sehr spezielle Fluorochrome; interessant ist vor allem das online verfügbare *Molecular Probes® Handbook*, welches einen der umfassendsten und gut gegliederten Überblick über aktuelle Fluorochrome und deren Anwendungsgebiete bietet.

- Waldeck-Chroma, <https://www.waldeck-ms.de>, Fluorochrome, Farbstoffe für die Mikroskopie

Die Firma Omikron beliefert zum Teil auch Privatanwender. Aufgrund aktueller gesetzlicher Vorschriften muss der Besteller Auskunft über den Verwendungszweck der bestellten Chemikalien geben (z.B. kurze Beschreibung der Bestimmung des Fluorochroms). Man sollte in einem Telefonat mit dem Vertriebskontakt bei Erstbestellung die Vorgehensweise zuvor klären. Die Anbieter sind erfahrungsgemäß sehr aufgeschlossen. Bei einigen Anbietern ist ein Gewerbenachweis oder Nachweis der Einrichtung (Institut, Schule) gefordert.

Mikroliterpipetten und Laborglas, Verbrauchsmaterial, wie Pipettenspitzen oder Nitrilhandschuhe kann man im Fachhandel oder auch günstig über die einschlägigen Internet Plattformen und Auktionshäuser erwerben. Ein Vergleich der Preise lohnt sich.

Gelegentlich werden auf den Handelsplattformen verschiedene Fluorochrome günstig in undefinierter (d.h. ohne Zertifikat), meist technischer Qualität angeboten. Auf diese Qualität sollte im Interesse einer Nachvollziehbarkeit bei geplanten Publikationen verzichtet werden.

Weiterführende Literatur

1. Chen, L. B. (1988). *Mitochondrial membrane potential in living cells*. Annual review of cell biology, 4(1), 155-181.
2. Gear, Adrian RL. *Rhodamine 6G a potent inhibitor of mitochondrial oxidative phosphorylation*. Journal of Biological Chemistry 249.11 (1974): 3628-3637.
3. Johnson, L. V., Walsh, M. L., & Chen, L. B. (1980). *Localization of mitochondria in living cells with rhodamine 123*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 77(2), 990-994.
4. Molecular Probes® Handbook (online version). Comprehensive guide to fluorescent probes and labeling technologies.
5. Morris, G. J., Coulson, G. E., & Leeson, E. A. (1985). *Changes in the shape of mitochondria following osmotic stress to the unicellular green alga Chlamydomonas reinhardtii*. Journal of cell science, 76(1), 145-153.
6. Otto, F., & Tsou, K. C. (1985). *A comparative study of DAPI, DIPI, and Hoechst 33258 and 33342 as chromosomal DNA stains*. Stain technology, 60(1), 7-11.
7. Pawley, James. *Handbook of biological confocal microscopy*. Springer. 3. Auflage. 2006. ISBN: 978-0387259215
8. Shea, C. R., Chen, N., & Hasan, T. (1989, March). *Phototoxicity of rhodamine dyes*. In OE/Fiber LASE'88 (pp. 48-57). International Society for Optics and Photonics.
9. Stickens, D., & Verbelen, J. P. (1996). *Spatial structure of mitochondria and ER denotes changes in cell physiology of cultured tobacco protoplasts*. The Plant Journal, 9(1), 85-92.
10. Wachsmuth, Ernst Dieter. *A comparison of the highly selective fluorescence staining of fungi in tissue sections with Uvitex 2B and Calcofluor White M2R*. The Histochemical Journal 20.4 (1988): 215-221.