

Wird keine detaillierte Abbildung der Gewebestrukturen benötigt, kann man Gewebe einfach anschneiden und die frische Schnittfläche auf Filterpapier oder Membran aufdrücken. Um mehr Details erkennen zu können, werden frische oder gefrorene Gewebeschnitte auf Nylon- oder Nitrozellulosemembranen übertragen. Gelingt dies, ohne dass der Schnitt dabei verschoben wird, entsteht dabei ein genauer Abdruck des entsprechenden Gewebeanschnittes auf der Membran. Dieser kann angefärbt und betrachtet werden. Die aus dem Gewebe ausgetretenen Moleküle haften an der Membran und können z. B. angefärbt oder mit Hilfe von Antikörpern, Enzymreaktionen oder mit Hilfe von RNA- oder DNA-Sonden (Romeis 18. Aufl., 2010) spezifisch sichtbar gemacht und mit Hilfe eines Auflichtmikroskops oder Makroobjektivs dokumentiert werden.

Für relativ feste und dicke Pflanzenteile (z. B. Stängel, verdickte Wurzeln) eignen sich Handschnitte (siehe Romeis, 18. Aufl., 2010) als Ausgangsmaterial für den Tissue-Print. Die Gewebe dürfen nicht zu trocken oder faserig sein. Sehr gute Ergebnisse erzielt selbst der Anfänger mit Sellerie-, Rhabarberstängeln oder Karotten. Weiche Gewebe (z. B. Blüten) stauchen oder verziehen sich zu stark beim Schneiden mit der Rasierklinge; sie werden z. B. in Agar eingebettet und mit dem Vibratom geschnitten. Wenig geeignet für Tissue-Prints sind sehr stärke- oder ölreiche Gewebe, da diese Inhaltsstoffe die Membran verkleben, die nachzuweisenden Moleküle maskieren können und damit deren Nachweise erschweren. Auch stark austretender Saft wirkt sich nachteilig auf die Qualität des Abdrucks aus. Stark nässende Schnitte tupft man daher zunächst auf Filterpapier ab und bringt sie erst dann auf die Membran auf.

Selbstverständlich trägt man bei dem Tissue-Printing Einmalhandschuhe und fasst die Membran nur am Rand mit einer ethanolgereinigten Pinzette an. Ebenso legt man die Membran nur auf eine trockene und saubere Unterlage.

Für den späteren Nachweis von Proteinen durch Antikörper (=Western-Tissue-Print) wählt man normalerweise eine unbehandelte Nitrozellulosemembran für

den Tissue-Print. Sollen Zellwandproteine von Pflanzen lokalisiert werden, wird die Membran vor Verwendung für 30 min mit 0,2 M CaCl_2 (in H_2O) getränkt und dann getrocknet. Für den Nachweis von Nukleinsäuren (=Northern-Tissue-Print) eignen sich alle Arten von Membranen ohne Vorbehandlung. Wegen der einfachen Handhabung und höherer Sensitivität und Auflösung werden meistens Nylonmembranen eingesetzt.

Die Zusammensetzungen der in den Anleitungen verwendeten Puffer und Blockierlösungen finden sich z. B. im Romeis (18. Aufl., 2010).

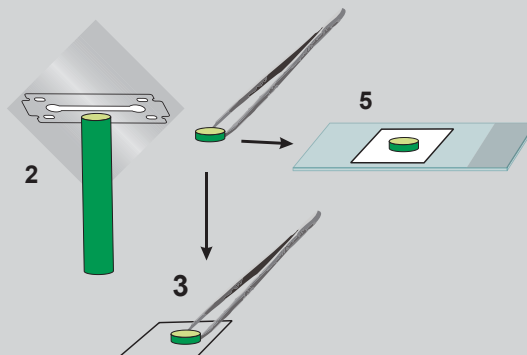
Anleitung A1

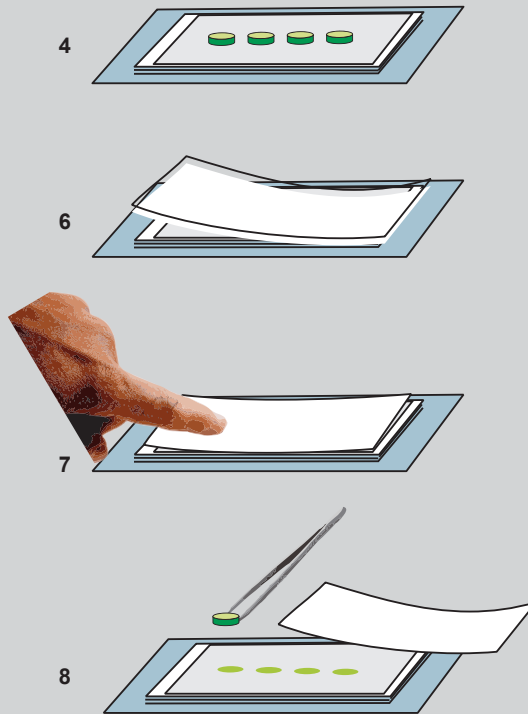
Anfertigen von Tissue-Prints von festem Pflanzenmaterial

Material

- Pflanzenmaterial
- Whatman-Filterpapier Nr. 1
- glattes Papier
- Nitrozellulose-, Nylon- oder PVDF-Membran
- Schere
- unbenutzte, entfettete Rasierklingen
- stumpfe Pinzette
- Einmalhandschuhe
- saugfähige Papiertücher
- feste, glatte Unterlage (Plastiktablett oder Glasplatte)
- weicher Bleistift (zum Markieren und Beschriften der Prints)
- Stereolupe zum Betrachten

Durchführung





Die Reihenfolge der Schritte in der Schemazeichnung entspricht der im Text beschriebenen

1. Sechs Lagen Filterpapier auf die Unterlage legen, mit einer glatten Papierlage abdecken und darauf die Membran platzieren. Die Größe der verwendeten Membran und des Filterpapiers ist abhängig von der Schnittgröße und der gewünschten Anzahl der Prints. Aus praktischen Gründen wählt man eher kleinere Formate. Die Membran sollte immer etwas kleiner zugeschnitten sein als das Filterpapier
2. mit der Rasierklinge gleichmäßig dünne (0,2–2 mm, je nach Gewebe und Fragestellung) Handschnitte (siehe Romeis, 18. Aufl., 2010) anfertigen
3. jeden Schnitt direkt mit der Pinzette abheben und auf einem separaten Stück saugfähigen Papiers kurz und leicht abtupfen

4. der Schnitt wird mit der abgetupften Seite auf die Membran aufgelegt. Man darf beim Auflegen den Schnitt nicht verziehen und nach dem Auflegen nicht mehr verschieben, um einen klaren Abdruck zu bekommen
5. zum anatomischen Vergleich empfiehlt es sich, zusätzlich Schnitte auf Objektträger zu übertragen und zur mikroskopischen Untersuchung anzufärben (siehe Romeis, 18. Aufl., 2010)
6. nachdem eine Reihe von Schnitten auf die Membran gelegt wurde, bedeckt man sie mit mehreren Lagen von Papiertüchern
7. durch die Abdeckung übt man für 15–20 Sekunden mit dem Finger leichten und gleichmäßigen Druck auf jeden Schnitt aus. Je fester man presst, desto mehr Inhaltsstoffe gelangen auf die Membran und desto dichter aber auch verwaschener kann nachher der Abdruck wirken. Für Immunmarkierungen genügt normalerweise nur ein sehr leichtes Andrücken
8. nachdem alle Schnitte so behandelt sind, entfernt man Abdeckung und Schnitte vorsichtig mit der Pinzette und lässt die Membran trocknen
9. da viele Pflanzengewebe fluoreszierende Inhaltsstoffe haben, kann man deren Abdrücke direkt unter UV-Beleuchtung betrachten. Vor Markierungen von DNA oder RNA sollte man dies jedoch vermeiden. Zum Anfärben dient z. B. Coomassie-Blau (A3). Für den Nachweis von Zellinhaltsstoffen (Kapitel 5) werden ungefärbte Tissue-Prints verwendet.



<http://www.springer.com/978-3-658-03866-3>

Tissue-Printing

Ein Überblick

Mulisch, M.

2014, VII, 20 S. 4 Abb. in Farbe., Softcover

ISBN: 978-3-658-03866-3