Fachtheorie nach Lernfeldern für Chemielaboranten – Teil 3

Biochemische und mikrobiologische Arbeiten

Angelika Janß

Best.-Nr. 1620
Holland + Josenhans Verlag Stuttgart

Bildquellenverzeichnis

1-1 Universität Ulm, Vorlesungssammlung Physik; **1-4** Gilbert, P. u. a. (Hrsg.): Zellbiologie (Grüne Reihe), 2006, Schroedel Verlag Braunschweig; **1-6** Jaenicke, J. (Hrsg.): Biologie heute, 2004, Schroedel Verlag Braunschweig; **1-7** Kampf, M. und Starke, A. (Hrsg.): Biologie heute – Arbeitsheft, 2006, Schroedel Verlag Braunschweig; **1-9** http://rsb.info.nih.gov/ij/images von http://en.wikipedia.org/wiki/File:FluorescentCells.jpg; **1-10** Bast, Eckhard: Mikrobiologische Methoden. Eine Einführung in grundlegende Arbeitstechniken, 3. Aufl. 2012, Spektrum Akademischer Verlag; **1-13** Campbell, N.A.: Biologie, Pearson Education, USA

2-6 Mikrobiologische Methoden. Eine Einführung in grundlegende Arbeitstechniken, Bast, Eckhard, 3. Aufl., 2012, Spektrum Akademischer Verlag; **2-7** Angelika Janß, Hamburg; **2-8** www.schoolwork.de; **2-24** Wikipedia (bacterial lawn)

3-3 Brock: Mikrobiologie, Pearson, USA; **3-4** THALETEC GmbH, alle Rechte vorbehalten; **3-5** Folienserie des Fonds der Chemischen Industrie 20, Frankfurt; **3-7** modifiziert nach Dellweg, Hanswerner: Biotechnologie verständlich, 1994, ISBN 978-3-540-56900-8; **3-9** Brock: Mikrobiologie, Pearson, USA

4-4 File:Human-insulin-hexamer-3D-ribbons.png von Wikipedia (Insulina), User Benjah-bmm27 http://es.wikipedia.org/wiki/Archivo:Human-insulin-hexamer-3D-ribbons.png

6-1 FIZ CHEMIE http://www.chemgapedia.de; **6-7** Richter, G.: Praktische Biochemie 2003, Thieme-Verlag, Stuttgart; **6-8** © BAM Bundesanstalt für Materialforschung und -prüfung; **6-9** Eppendorf AG, Hamburg

7-9 Angelika Janß, Hamburg; **7-13** Angelika Janß; **7-15** Roche Diagnostics GmbH, Mannheim; **7-19** nach Richter, G.: Praktische Biochemie, Georg Thieme Verlag, Stuttgart; **7-20 links** Hochschule Hannover, Abteilung Bioverfahrenstechnik, Fakultät 2

8-1 Bayrhuber, H. und Kull, U. (Hrsg.): Linder Biologie, 2005, Schroedel Verlag Braunschweig; **8-2** Campbell, N.A.: Biologie, Pearson Education, USA; **8-3** Heinzeller, Büsing: Histologie, Histopathologie und Zytologie für den Einstieg, 2001, Georg Thieme Verlag Stuttgart; **8-4** modifiziert nach Campbell, N.A.: Biologie, Pearson Education, USA; **8-5** Campbell, N.A.: Biologie, Pearson Education, USA; **8-6 oben** Nycomed GmbH, Institute of Pharmacology and Preclinical Drug Safety, Barsbüttel; **8-6 unten** K. I. Mühlenfeld: Untersuchungen zur Biotransformation und Toxizität mit der Hepatomzellinie Hep G2 im Vergleich zu Primärkulturen der Wistarratte". Dissertation, Humbolt Universität Berlin, 1999; **8-8** © Greiner Bio-One GmbH, 72636 Frickenhausen, Deutschland, 2011; **8-9** Mühlenfeld, Katrin: Dissertation der Humboldt-Universität zu Berlin, 1999; **8-10** Alcibiades, Wikipedia.de; **8-11** Cytonet GmbH & Co. KG, Weinheim; **8-12 rechts** Niedersächsisches Landesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit; **8-15** Nycomed GmbH, Institute of Pharmacology and Preclinical Drug Safety, Barsbüttel; **8-18** Prof. Dr. Staudenmaier, Rainer, München; **8-19** Bayrhuber, H., Lucius, E. R. (Hrsg.): Handbuch der praktischen Mikrobiologie und Biotechnik Bd. 2, 1997, Schroedel Verlag Braunschweig; **8-20** Bayrhuber, H., Lucius, E. R. (Hrsg.): Handbuch der praktischen Mikrobiologie und Biotechnik Bd. 2, 1997, Schroedel Verlag Braunschweig; **8-21** www.biologie.uni-hamburg.de

Zeichnungen, sofern nicht oben aufgelistet, wurden von der Firma CMS – Cross Media Solutions, Würzburg erstellt.

Trotz intensiver Bemühungen ist es uns nicht gelungen, die Urheber einiger Abbildungen zu ermitteln. Die Rechte dieser Urheber werden selbstverständlich vom Verlag gewahrt und berechtigte Ansprüche im Rahmen der üblichen Regelungen abgegolten.

1. Auflage 2013

Die Normblattangaben werden wiedergegeben nach DIN Deutsches Institut für Normung e. V. Maßgebend für das Anwenden der Norm ist deren Fassung mit dem neuesten Ausgabedatum, die bei der Beuth Verlag GmbH, Burggrafenstraße 6, 10787 Berlin, erhältlich ist.

Dieses Werk folgt der reformierten Rechtschreibung und Zeichensetzung.

Das Werk und seine Teile sind urheberrechtlich geschützt. Jede Nutzung in anderen als den gesetzlich zugelassenen Fällen bedarf der vorherigen schriftlichen Einwilligung des Verlages.
Hinweis zu § 52 a UrhG: Weder das Werk noch seine Teile dürfen ohne eine solche Einwilligung eingescannt und in ein Netzwerk eingestellt werden. Dies gilt auch für Intranets von Schulen und sonstigen Bildungseinrichtungen.

Die Verweise auf Internetadressen und -dateien beziehen sich auf deren Zustand und Inhalt zum Zeitpunkt der Drucklegung des Werks. Der Verlag übernimmt keinerlei Gewähr und Haftung für deren Aktualität oder Inhalt noch für den Inhalt von mit ihnen verlinkten weiteren Internetseiten.

© Holland+Josenhans GmbH & Co. KG, Postfach 102352, 70019 Stuttgart, 2011
Telefon: 0711/6143915, Fax: 0711/6143922
E-Mail: verlag@holland-josenhans.de
Internet: www.holland-josenhans.de

Umschlagabbildungen: adpic Bildagentur, 53121 Bonn;
CMS – Cross Media Solutions GmbH, 97080 Würzburg
Technische Umsetzung: CMS – Cross Media Solutions GmbH, 97080 Würzburg
Druck und Bindung: Stürtz GmbH, 97080 Würzburg

ISBN: 978-3-7782-1620-0

Vorwort

Die Fachtheorie für Chemielaboranten Teil 3 folgt auf die beiden gleichnamigen Lehrbücher Teil 1 und 2, die bisher in den Verlagen Handwerk und Technik und Holland + Josenhans erschienen sind. Grundlage ist der Rahmenlehrplan für den Ausbildungsberuf Chemielaborantin/Chemielaborant, insbesondere die Lernfelder 14, 17 und 18, die die biologisch orientierten Wahlpflichtqualifikationseinheiten berücksichtigen.

Die dort beschriebenen Zielformulierungen sehen ein sachverständiges Arbeiten mit biologischem Material vor, wie es in chemischen Laboratorien normalerweise nicht üblich ist.

Deshalb wurden in einem lernfeldübergreifenden Einführungskapitel wichtige zellbiologische Grundlagen dargestellt sowie spezielle biologische Arbeitsmethoden beschrieben. Die 3 Lernfelder wurden sodann in 7 Kapitel unterteilt, die größtenteils unabhängig voneinander sind. Dieser Aufbau gestattet es den Lesern, für sie individuell wichtige Themen leichter aufzufinden und sich die Inhalte zu erarbeiten.

Damit kann das Buch auch für die Ausbildung in anderen biologischen und chemischen Laborberufen verwendet werden.

Der Zusammenhang zwischen den einzelnen Kapiteln und den Inhalten der Lernfelder und des Ausbildungsrahmenplans ist tabellarisch auf Seite 140 dargestellt.

Die naturwissenschaftlichen Grundlagen der Arbeitsmethoden wurden möglichst genau dargestellt, weil sie aus den häufig verwendeten vorgefertigten Kits und den speziellen Geräten oft nicht mehr ersichtlich sind.

Obwohl sich die Arbeit von Chemielaborantinnen und Chemielaboranten im Allgemeinen auf die laborpraktische Anwendung mikrobiologischer, biochemischer und molekularbiologischer Methoden beschränken wird, wurde versucht, in geraffter Form auch auf die biologischen Zusammenhänge im lebendigen Organismus einzugehen, um die große Bedeutung dieser Arbeiten herauszustellen. Für detailliertere Informationen sei auf Lehrbücher der Biologie verwiesen.

Die Autorin dankt beiden Verlagen für die Unterstützung. Sie und der Verlag Holland + Josenhans bitten die Benutzer des Buches um kritische Hinweise.

Die Verfasserin

Inhaltsübersicht

1 Charakterisierung und Untersuchung lebender Zellen und ihrer Inhaltsstoffe 9

1.1 Kennzeichen des Lebens 9

1.2 Feinbau von Zellen 9
1.2.1 Aufbau eukaryotischer Zellen 10
1.2.2 Aufbau prokaryotischer Zellen 11

1.3 Inhaltsstoffe der Zelle 11
1.3.1 Proteine 12
1.3.2 Lipide 12
1.3.2.1 Fette 12
1.3.2.2 Phospholipide 13
1.3.2.3 Steroide 13
1.3.3 Kohlenhydrate 13
1.3.3.1 Monosaccharide 13
1.3.3.2 Disaccharide 14
1.3.3.3 Polysaccharide 15
1.3.4 Nucleinsäuren 17

1.4 Mikroskopische Untersuchung von Zellen 17
1.4.1 Lichtmikroskopie 17
1.4.1.1 Vergrößerung und Beleuchtung 17
1.4.1.2 Auflösung 19
1.4.1.3 Kontrast 19
1.4.1.4 Fluoreszenzmikroskopie 20
1.4.2 Elektronenmikroskopie 21

1.5 Zellaufschluss und Zellfraktionierung 21
1.5.1 Zellaufschlussverfahren 21
1.5.1.1 Mechanische Aufschlussverfahren . . . 21
1.5.1.2 Nicht-mechanische Aufschlussverfahren 22
1.5.2 Zellfraktionierung durch Zentrifugation 22
1.6 Aufgaben 24

2 Durchführung mikrobiologischer Arbeiten . 25

2.1 Wesen der Mikroorganismen 25
2.1.1 Bedeutung 25
2.1.2 Größe 25
2.1.3 Produktivität 25
2.1.4 Stoffwechselvielfalt und Anpassungsfähigkeit 26
2.1.5 Reizbarkeit und Bewegung 26

2.2 Lebensräume und Wachstumsbedingungen 26
2.2.1 Ernährungsweisen 26
2.2.1.1 Autotrophe und heterotrophe Ernährung 26
2.2.1.2 Phototrophe und chemotrophe Energiegewinnung 26
2.2.1.3 Lithotrophe und organotrophe Stoffwechselreaktionen 26
2.2.2 Lebensräume 27
2.2.2.1 pH-Abhängigkeit 27
2.2.2.2 Sauerstoffverträglichkeit 27
2.2.2.3 Temperaturabhängigkeit 27
2.2.3 Kultivierung 28
2.2.3.1 Nährmedien 28
2.2.3.2 Sauerstoff 29
2.2.3.3 Temperatur 29
2.2.4 Wachstum und Vermehrung 29

2.3 Hemmung des Wachstums 31
2.3.1 Sterilisation und Desinfektion 31
2.3.2 Sterilfiltration 31
2.3.2.1 Sterilwerkbänke 32
2.3.3 Sterilisation durch Hitze 32
2.3.3.1 Autoklavieren (Dampfsterilisation) . . . 32
2.3.3.2 Heißluftsterilisation 32
2.3.3.3 Ausglühen und Abflammen 33
2.3.4 Bestrahlung 33

2.3.5 Desinfektionsmittel 33
2.3.6 Antibiotika 33

2.4 Wichtige Mikroorganismen und Viren 34
2.4.1 Nomenklatur 34
2.4.2 Pilze 34
2.4.2.1 Schimmelpilze 34
2.4.2.2 Hefen 35
2.4.2.3 Wichtige Vertreter der Schimmelpilze und Hefen 35
2.4.3 Bakterien 35
2.4.3.1 Besonderheiten von Bakterien 36
2.4.3.2 Wichtige Vertreter 38
2.4.4 Viren 38

2.5 Untersuchung von Mikroorganismen 39
2.5.1 Gewinnung und Reinigung von Mikroorganismen 39
2.5.1.1 Gewinnung von Mikroorganismen . . . 39
2.5.1.2 Reinigung der Kulturen 39
2.5.2 Charakterisierung der Kolonien 40
2.5.3 Mikroskopische Untersuchung 40
2.5.3.1 Gramfärbung 40
2.5.3.2 Hängender Tropfen 41
2.5.4 Bestimmung von Zellzahl und Bakteriendichte 41
2.5.4.1 Lebendzellzahl = Keimzahl 42
2.5.4.2 Gesamtzellzahl 42
2.5.4.3 Trübungsmessung 43
2.5.5 Identifizierung 44
2.5.5.1 Kohlenhydratabbau 44
2.5.5.2 Oxidation und Fermentation 44
2.5.5.3 Oxidase und Katalase 45
2.5.5.4 Indol 45
2.5.6 Hemmstofftests 45
2.5.6.1 Agardiffusionstest 45
2.5.6.2 Reihenverdünnungstest 46

2.6 Mikrobiologische Sicherheitsanforderungen 46
2.6.1 Vorschriften 46
2.6.2 Biologische Agenzien 46
2.6.3 Technische Schutzmaßnahmen 47
2.7 Aufgaben 48

3 Durchführung biotechnologischer Arbeiten 49

3.1 Arbeitsgebiete der Biotechnologie . . . 49

3.2 Zellwachstum und Produktbildung . . 50
3.2.1 Parameter und Berechnungen 50
3.2.1.1 Zellzahl 50
3.2.1.2 Zellmasse 50
3.2.2 Wachstumsphasen und Produkte 51

3.3 Bioreaktoren und Verfahren 51
3.3.1 Bioreaktoren 51
3.3.2 Maßstabsvergrößerung 52
3.3.3 Verfahren und Betriebsweisen 53
3.3.3.1 Emers- und Submersverfahren 53
3.3.3.2 Kontinuierliche und diskontinuierliche Fermentation 53
3.3.4 Aufarbeitung der Produkte 53

3.4 Wichtige Produkte und Prozesse 54
3.4.1 Gärungsprodukte 54
3.4.1.1 Hefe und Ethanol 54
3.4.1.2 Milchprodukte und Silagefutter 55
3.4.1.3 Essig 55
3.4.2 Antibiotika 55
3.4.2.1 Penicilline 55
3.4.2.2 Weitere Antibiotika 55
3.4.3 Organische Säuren und Aminosäuren . 56
3.4.3.1 Citronensäure 56
3.4.3.2 Glutaminsäure 56
3.4.4 Enzyme 56
3.4.4.1 Amylasen und Proteasen 56
3.4.4.2 Alkohol-Dehydrogenase 57
3.4.5 Abwasserreinigung 57
3.4.6 Erzlaugung 57
3.5 Aufgaben 58

4 Durchführung biochemischer Arbeiten 59

4.1 Eigenschaften und Untersuchung von Aminosäuren 59
4.1.1 Säure-Base-Eigenschaften und isoelektrischer Punkt 61
4.1.1.1 Pufferwirkung 62
4.1.1.2 Isoelektrischer Punkt 62
4.1.2 Auftrennung und Nachweis 63
4.1.2.1 Dünnschichtchromatografie DC 63
4.1.2.2 Ionenaustauschchromatografie 63
4.1.2.3 Elektrophorese 64

4.2 Eigenschaften und Nachweis von Peptiden 64
4.2.1 Aufbau der Peptidbindung 64
4.2.1.1 Aminosäuresequenz 65
4.2.1.2 Geometrie der Peptidbindung 65
4.2.2 Nachweis der Peptidbindung durch Biuretreaktion 66

4.3 Aufbau und Eigenschaften von Proteinen 66
4.3.1 Räumliche Strukturen 66
4.3.1.1 Primärstruktur 67
4.3.1.2 Sekundärstruktur 67
4.3.1.3 Tertiärstruktur 68
4.3.1.4 Quartärstruktur 68
4.3.1.5 Proteinfaltung und Konformation 68
4.3.1.6 Denaturierung 69
4.3.2 Molekülmasse und physikalisch-chemische Eigenschaften 69
4.3.2.1 Molekülmasse 69
4.3.2.2 Physikalisch-chemische Eigenschaften 70
4.3.3 Einteilung der Proteine 70

4.4 Isolierung, Reinigung und Analyse von Proteinen 71
4.4.1 Isolierung und Reinigung 71
4.4.1.1 Ausfällung 71
4.4.1.2 Dialyse 72
4.4.2 Trennung von Proteingemischen 72
4.4.2.1 Gelfiltration 72
4.4.2.2 Gel-Elektrophorese 73
4.4.2.3 Polyacrylamidgel-Elektrophorese = SDS-PAGE 73
4.4.2.4 Isoelektrische Fokussierung IEF 74
4.4.3 Quantitative Bestimmung 74
4.4.3.1 Spektroskopisch durch UV-Absorption 75
4.4.3.2 Kolorimetrisch durch Absorption von sichtbarem Licht 75
4.4.3.3 Methoden zur Isolierung, Reinigung und Analyse von Proteinen 76
4.5 Aufgaben 77

5 Durchführung immunologischer und diagnostischer Arbeiten – Enzyme 78

5.1 Wirkungsweise von Enzymen 78
5.1.1 Katalyse 78
5.1.2 Spezifität 78
5.1.3 Reaktionsbedingungen 79
5.1.3.1 Temperatur 79
5.1.3.2 pH-Wert 79
5.1.3.3 Ionenstärke 79
5.1.4 Cofaktoren 80
5.1.5 Zusammenwirken von Enzym und Cosubstrat 80

5.2 Einteilung der Enzyme und Cofaktoren und wichtige Beispiele . . 81
5.2.1 Enzyme 81
5.2.2 Cofaktoren 83

5.3 Enzymaktivität und Enzymkinetik 84
5.3.1 Aktivität 84
5.3.2 Enzymkinetik 85
5.3.3 Hemmung von Enzymen 86

5.4 Enzymatische Analysen 87
5.4.1 Prinzip 87

5.4.2 Bestimmung von Ethanol 88
5.4.3 Bestimmung verschiedener Zucker nebeneinander 88
5.4.4 Bestimmung der Amylase-Aktivität 89
5.5 Aufgaben 90

6 Durchführung immunologischer und diagnostischer Arbeiten – Immunglobuline 91

6.1 Wichtige Bestandteile des Immunsystems 91
6.1.1 Antikörper 91
6.1.1.1 Klassen von Antikörpern 93
6.1.1.2 Gewinnung von Antikörpern 93
6.1.2 Antigene 93
6.1.3 Antigen-Antikörper-Reaktion 93
6.1.3.1 Bindungsstärke 93
6.1.3.2 Visuelle Auswertung 94
6.1.3.3 Spezifität 94
Biologischer Exkurs
Wie wehrt der menschliche Organismus Krankheitserreger ab? . . 95

6.2 Immunologische Testverfahren 95
6.2.1 Grundlagen 95
6.2.2 Immunpräzipitation 95
6.2.2.1 Immundiffusion 95
6.2.2.2 Immunelektrophorese 96
6.2.3 Quantitative Immunoassays 96
6.2.3.1 Radioimmunoassay (RIA) 96
6.2.3.2 Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) 96
6.2.3.3 Direkter ELISA 97
6.2.3.4 Kompetitiver ELISA 98
6.2.3.5 Sandwich-ELISA 98
6.2.4 Immunoblot = Western-Blot 99
6.3 Aufgaben 100

7 Durchführung molekularbiologischer Arbeiten 101

7.1 Aufbau der Nucleinsäuren 101
7.1.1 Bausteine der DNA 101
7.1.1.1 Nucleoside 101
7.1.1.2 Nucleotide 102
7.1.1.3 Polynucleotide 102
7.1.1.4 Aufbau der RNA 102
7.1.2 Räumliche Struktur der DNA 102
7.1.3 Molekülgröße 103
Biologischer Exkurs 1
Wie kann ein Molekül Informationen speichern? 104

7.2 Isolierung von DNA aus Zellen und Aufreinigung 104
7.2.1 Gewinnung von DNA durch klassische Extraktion 105
7.2.2 Gewinnung von DNA mit einem Präparationskit 106
7.2.3 Spezielle Präparationsmethoden 106
7.2.3.1 Plasmid-DNA 106
7.2.3.2 Pflanzen-DNA 106
7.2.4 Messung der DNA-Konzentration 106

7.3 Untersuchung der DNA 107
7.3.1 Vervielfältigung 107
7.3.1.1 Identische Replikation der DNA in der Zelle 107
7.3.1.2 Vervielfältigung von DNA-Abschnitten durch Polymerasekettenreaktion 108
7.3.2 Sequenzierung 111
7.3.3 Analyse der Produkte durch Elektrophorese 111
7.3.3.1 Gel-Elektrophorese 111
7.3.3.2 Kapillar-Gel-Elektrophorese 112
Biologischer Exkurs 2
Wie wird die genetische Information in Produkte umgesetzt? 112

7.4 Nucleinsäuren in der Diagnostik 113
7.4.1 Blotting-Verfahren 113

7.4.2 Hybridisierung mit Gensonden 114
7.4.3 Mikroarrays 114

7.5 Gentechnische Operationen 115
7.5.1 Schneiden und Verbinden von DNA-Molekülen 115
7.5.1.1 Schneiden mit Restriktionsenzymen 115
7.5.1.2 Verbinden mit Ligase 116
7.5.1.3 Rekombinante DNA 116
7.5.2 Einführen von DNA in Bakterienzellen 116
7.5.2.1 Molekulare Klonierung 116
7.5.2.2 Vektoren 116
7.5.2.3 Transformation 116
7.5.2.4 Kompetente Zellen 116
7.5.3 Nachweis einer erfolgreichen Klonierung 117
7.5.3.1 pUC-Plasmide 117
7.5.3.2 Blau-Weiß-Selektion = blue-white-screening 117
7.5.4 Anwendungen 118
7.5.4.1 Produkte gentechnisch veränderter Bakterien 118
7.5.4.2 Gentechnisch veränderte Nutzpflanzen 118
7.5.5 Gentechnische Sicherheitsanforderungen 118
7.5.5.1 Gentechnikgesetz 118
7.5.5.2 Weitere Vorschriften 119
7.6 Aufgaben 119

8 Durchführung zellkulturtechnischer Arbeiten 121

8.1 Besonderheiten eukaryotischer Zellen 121
8.1.1 Zellkern und Chromosomen 121
8.1.1.1 Chromosomensatz 121
8.1.1.2 Feinbau der Chromosomen 121
8.1.2 Wachstum und Zellteilung 122
8.1.3 Alter und Tod von Zellen 123

8.2 Differenzierung von Zellen und Typen von Geweben 123
8.2.1 Gewebe tierischer Organismen 124
8.2.2 Gewebe pflanzlicher Organismen 125

8.3 Haltung tierischer Zellen im Labor . . . 126
8.3.1 Gewinnung von Zellen 127
8.3.1.1 Primärkulturen 127
8.3.1.2 Zelllinien 127
8.3.2 Kultivierung 127
8.3.2.1 Wachstum und Proliferation 127
8.3.2.2 Nährmedien 128
8.3.2.3 Arten von Zellkulturen 129
8.3.3 Routinemethoden im Zellkulturlabor . 130
8.3.3.1 Wechsel des Mediums und Subkultivierung 131
8.3.3.2 Zellzählung 131
8.3.3.3 Langzeitlagerung und Kryokonservierung 131
8.3.4 Kontamination 132

8.4 Besondere Verfahren 133
8.4.1 Produktion größerer Zellmengen 133
8.4.2 Kultur von Hybridomazellen 134
8.4.3 Toxikologische Testverfahren 135
8.4.3.1 Ablösungsassay 136
8.4.3.2 Neutralrot-Test 136
8.4.3.3 MTT-Test 136
8.4.3.4 LDH-Test 136
8.4.4 Tissue Engineering 136

8.5 Pflanzliche Zellkulturen 137
8.5.1 Besonderheiten des pflanzlichen Organismus 137
8.5.2 Kalluskulturen 138
8.5.3 Kultivierung und Fusion von Protoplasten 138
8.6 Aufgaben 139

Fachtheorie nach Lernfeldern für Chemielaboranten Teil 3, Aufbau des Buches . . 140
Sachwortverzeichnis 141

1 Charakterisierung und Untersuchung lebender Zellen und ihrer Inhaltsstoffe

1.1 Kennzeichen des Lebens

Während sich die Chemie mit der unbelebten Natur, d. h. mit den Stoffen, ihren Eigenschaften und ihren Veränderungen beschäftigt, untersucht die Biologie Lebewesen und Lebenserscheinungen. Es ist also ein großer Unterschied, ob man das Wachstum von Kristallen in einer Salzlösung untersucht oder das Wachstum von Algen und Insektenlarven in einem Tümpel.

Abb. 1.1 chemischer Garten

Abb. 1.2 Wasserpflanzen im Aquarium

Wenn aus wenigen Kristallen von Schwermetallsalzen bizarre Gebilde entstehen, die an Aquarienpflanzen erinnern, so handelt es sich – naturwissenschaftlich betrachtet – um Kristallisationsvorgänge der unbelebten Natur. Lebendige Organismen dagegen wachsen, indem sie durch unzählige miteinander koordinierte biochemische Reaktionen Baustoffe und Energie gewinnen. Sie sind fähig, auf Reize aus ihrer Umgebung zu reagieren und sich an veränderte Lebensbedingungen anzupassen. Sie können sich fortpflanzen und dabei den größten Teil ihrer Erbinformationen an ihre Nachkommen weitergeben, und letztlich sind sie in der Lage abzusterben. Obwohl eine eindeutige Definition des Begriffs „Leben" sich äußerst schwierig gestaltet, fasst der folgende Satz die wesentlichen Charakteristika zusammen.

Leben ist eine organisierte genetische Einheit, die zu Stoffwechsel, Fortpflanzung und Evolution befähigt ist.

Als Kennzeichen des Lebendigen fasst man auch die folgenden Merkmale zusammen:

- **Gestalt,**
- **Stoffwechsel,**
- **Reizbarkeit,**
- **Bewegung,**
- **Fortpflanzung,**
- **Entwicklung,**
- **Anpassung an die Umwelt.**

Alle lebensfähigen Organismen lassen sich auf einen Grundbaustein zurückführen: die Zelle. Schon Organismen, die wie Bakterien oder einige Algen nur aus einer einzigen Zelle bestehen, zählen demnach zu den Lebewesen. Viren dagegen, die weder über einen zellulären Aufbau noch über einen selbstständigen Stoffwechsel verfügen, sind lediglich Partikel ohne vollständige Kennzeichen des Lebendigen.

1.2 Feinbau von Zellen

Da die meisten Zellen kleiner als 0,1 mm sind, lassen sie sich nur mit Hilfe eines Mikroskops sichtbar machen. Dabei zeigt sich, dass ihrem Aufbau ein gemeinsames Prinzip zugrunde liegt. Alle Zellen werden durch eine **Zellmembran** von ihrer Umwelt abgegrenzt, die durch ihren komplizierten Aufbau (▶ s. Abb. 1.4, S. 11) aber auch einen Stoffaustausch mit der Umgebung ermöglicht. Der Zellinhalt mit Ausnahme des Zellkerns wird als **Cytoplasma** bezeichnet. Es besteht aus dem Grundplasma (Cytosol) und den darin eingebetteten **Zellorganellen**.

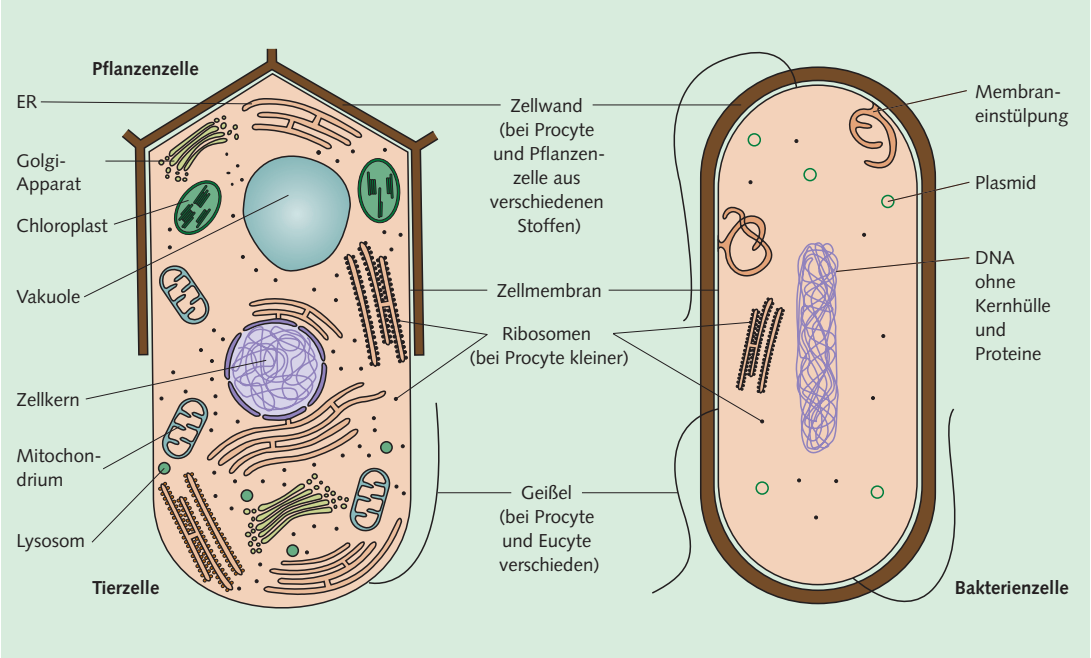


Abb. 1.3 Prokaryotische und eukaryotische Zelle im Vergleich

Dabei handelt es sich um Strukturen mit einer bestimmten Funktion wie z. B. der Zellatmung.

Außer vielfältigen Unterschieden in Größe, Gestalt, Aufbau und Funktion gibt es zwischen den Zellen von höheren Lebewesen und Bakterien vor allem *ein* wesentliches Unterscheidungsmerkmal:

- Zellen von Menschen, Tieren und Pflanzen, aber auch solche von Pilzen haben einen **Zellkern** (gr. *karyon*) und werden daher als **Eukaryoten** (gr. *eu*, wahr, echt) bezeichnet.
  Der Zellkern ist durch eine Kernhülle vom Cytoplasma abgegrenzt und enthält die Chromosomen mit ihrer Erbsubstanz Desoxyribonucleinsäure, DNS (engl. DNA = Desoxribonucleinacid, heute gebräuchlich).
- Zellen von Bakterien dagegen besitzen nur ein Kernäquivalent ohne Abgrenzung gegenüber dem Cytoplasma und werden daher **Prokaryoten** genannt. Das auch als Bakterienchromosom bezeichnete Kernäquivalent besteht aus einem DNA-Molekül ohne Hülle.

Insgesamt sind eukaryotische Zellen wesentlich stärker strukturiert als prokaryotische.

1.2.1 Aufbau eukaryotischer Zellen

Tierische und pflanzliche Zellen weisen viele Gemeinsamkeiten auf, unabhängig davon, ob sie der menschlichen Oberhaut oder dem Grundgewebe eines Laubblattes entstammen.

Ihre Gestalt wird nicht nur durch die Zellmembran bestimmt, sondern zusätzlich durch ein Netzwerk aus Proteinen, das **Cytoskelett**, stabilisiert.

Unter den Organellen stellt der von einer Kernhülle umgebene **Zellkern** (lat. *nucleus*) die größte Funktionseinheit dar. Er ist nicht nur für die Vererbung zuständig, sondern steuert alle Lebensvorgänge der Zelle, denn das Makromolekül Desoxyribonucleinsäure enthält alle dafür notwendigen Informationen. Der gesamte DNA-Gehalt des Zellkerns ist bei den Eukaryoten auf eine für jeden Organismus spezifische Anzahl von Chromosomen verteilt (▶ siehe Kapitel 8.1.1., S. 121).

Das gesamte Plasma eukaryotischer Zellen wird von einem Membransystem durchzogen, das die Zelle in verschiedene Reaktionsräume unterteilt, dem **endoplasmatischen Retikulum**, kurz: **ER**. Es dient der Synthese und dem Transport von Stoffen. Membranen, teilweise mehrfach gefaltet, ummanteln auch andere Organellen. Der **Golgi-Apparat** besteht aus Membransäcken, den **Dictyosomen**, von denen die

Golgi-Vesikel abgeschnürt werden. Diese Bläschen sorgen für den Abtransport der in den Dictyosomen synthetisierten oder modifizierten Stoffe. Für viele Stoffwechselvorgänge wird Energie benötigt, die in den „Kraftwerken der Zelle", den **Mitochondrien**, erzeugt wird. Diese Organellen tragen an ihren Membranen Atmungsenzyme mit deren Hilfe Kohlenhydrate abgebaut und das energiereiche Molekül Adenosintriphosphat = ATP, aufgebaut werden. **Ribosomen** sind die kleinsten, nicht einmal von einer Membran umgebenen, Organellen. Dennoch erfüllen sie eine äußerst wichtige Aufgabe, nämlich die Synthese der Proteine.

Während die bisher beschriebenen Zellbestandteile bei allen Eukaryoten vorkommen, weisen tierische und pflanzliche Zellen einige Unterschiede auf. In **tierischen Zellen** gibt es zusätzlich spezielle Vesikel, die **Lysosomen**. Sie enthalten Verdauungsenzyme und zerlegen damit Makromoleküle. In **pflanzlichen Zellen** übernimmt eine mit Zellsaft gefüllte **Vakuole** diese Aufgabe. Sie dient darüber hinaus der Speicherung von Farbstoffen, Reservestoffen und Stoffwechselendprodukten. Grüne Pflanzen sind außerdem in der Lage, ihre Energie überwiegend durch Photosynthese aus dem Sonnenlicht zu gewinnen, da sie zusätzlich besondere Organellen, die **Chloroplasten**, enthalten. Letztere gehören ebenso wie Chromoplasten und Leukoplasten zu den **Plastiden**. Eine weitere Besonderheit pflanzlicher Zellen stellt der zusätzliche äußere Schutz durch eine Zellwand aus **Cellulose** dar.

Auch Zellen von Pilzen weisen eine Zellwand auf, die aber in der Regel aus **Chitin** besteht. Weitere Informationen über Pilze folgen im ▶ Kap. 2.4.2, S. 34.

1.2.2 Aufbau prokaryotischer Zellen

Auch prokaryotische Zellen enthalten **Ribosomen** für die Biosynthese der Proteine. Sie sind aber kleiner als bei Eukaryoten. Prokaryotischen Zellen fehlen dagegen alle durch Membranen abgegrenzten Organellen. Häufig ist die Zellmembran nach innen eingestülpt, sodass Falten entstehen, die manchmal als **Mesosomen** bezeichnet werden. Man schreibt ihnen eine Beteiligung bei Energie liefernden Prozessen zu. Im Cytoplasma finden sich außer dem Bakterienchromosom noch kleinere ringförmige DNA-Moleküle, die **Plasmide**. Die meisten Bakterienzellen haben eine **Zellwand** aus **Murein**. Viele Bakterien sind durch **Geißeln** beweglich, andere können sich mit Hilfe einer **Schleimkapsel**, auch **Glykokalyx** genannt, an einer Oberfläche festsetzen. Ausführlichere Informationen zum Bau der Bakterienzelle sind im ▶ Kap. 2.4.3, S. 35, zu finden.

1.3 Inhaltsstoffe der Zelle

Der mengenmäßig bedeutendste Inhaltsstoff aller Lebewesen ist Wasser. Zellen von Bohnensamen bestehen zu etwa 20 % daraus, Zellen von Quallen bis zu 98 %.

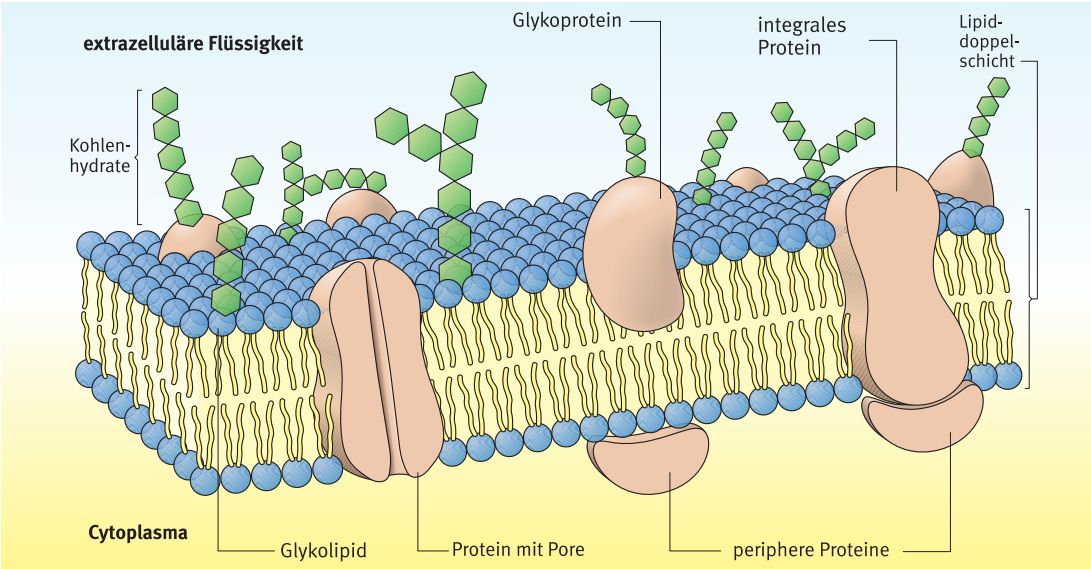


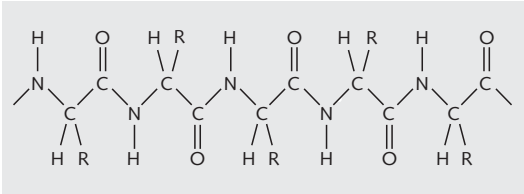
Abb. 1.4 Modell einer Biomembran

Aber natürlich sind ohne anorganische Salze und organische Moleküle keine physiologischen Vorgänge möglich. Vor allem organische Makromoleküle leisten wichtige Beiträge zum Aufbau von Zellen und zur Funktion aller Lebensvorgänge. Dabei wirken sie nicht nur als Reservestoffe, sondern nehmen wichtige Aufgaben wahr: Proteine wirken z. B. als Biokatalysatoren oder Hormone, Lipide sind wichtige Reservestoffe und stabilisieren Membranen, Kohlenhydrate verstärken Zellwände und Nucleinsäuren tragen die Erbinformationen eines Organismus.

Das komplizierte Zusammenspiel verschiedener Biomoleküle wird besonders beim Aufbau einer Membran deutlich. Eine Lipiddoppelschicht bildet die Grundlage dieser biologischen Begrenzung. Aufgelagert und eingebettet steuern Proteine die Durchlässigkeit, denn die Membran ist semipermeabel, d. h. sie lässt nur bestimmte Stoffe passieren. An der Außenseite findet man außerdem Kohlenhydrate.

1.3.1 Proteine

Proteine entstehen durch Polykondensation von 2-Aminocarbonsäuren.



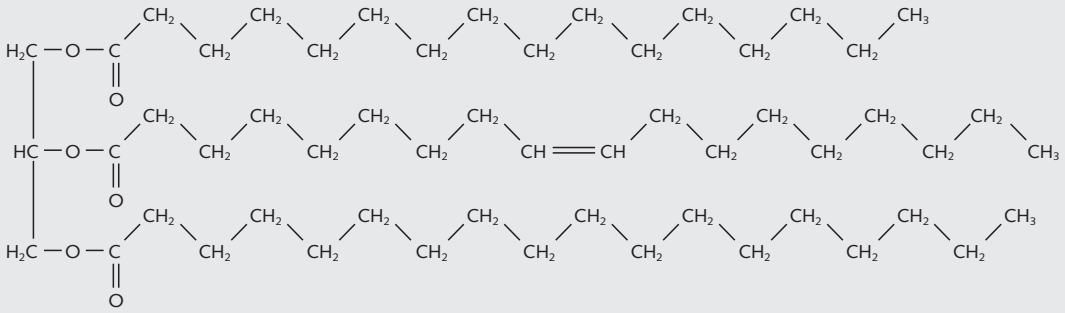
Dabei werden unter Mitwirkung der Seitenketten sterisch komplizierte Makromoleküle ausgebildet. Wegen ihrer großen Bedeutung ist den Proteinen das gesamte ▶ Kapitel 4, S. 59 gewidmet.

1.3.2 Lipide

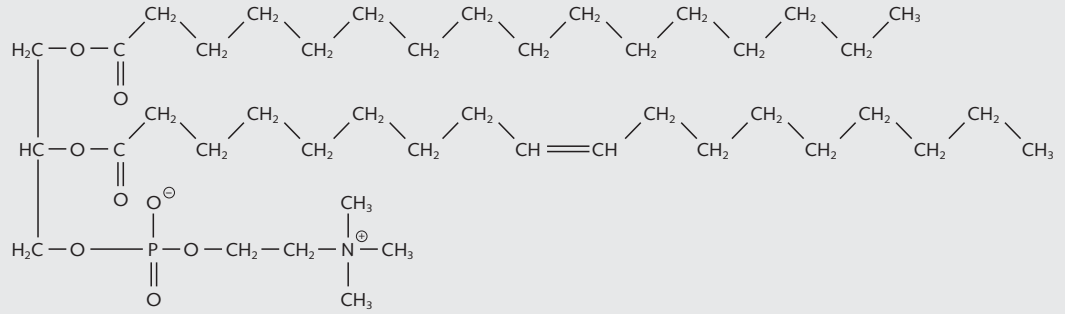
Zu den Lipiden werden außer den Fetten auch andere hydrophobe Stoffe gezählt, die chemisch unterschiedlichen Verbindungsklassen angehören.

1.3.2.1 Fette

Fette entstehen durch Veresterung des dreiwertigen Alkohols Glycerol mit drei Fettsäuren zu **Triglyceriden**. Dabei können in einem Molekül gleiche oder verschiedene Fettsäuren gebunden sein. Es handelt sich bei diesen um langkettige, unverzweigte gesät-



Triglycerid mit den Fettsäuren Palmitinsäure, Ölsäure, Stearinsäure



Phospholipid Lecithin

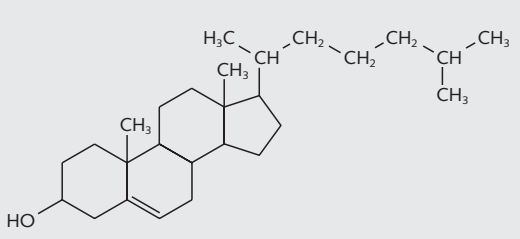
tigte oder ungesättigte Monocarbonsäuren mit einer geraden Anzahl von C-Atomen. (▶ s. Abb. Triglycerid, S. 12)

1.3.2.2 Phospholipide

In den Phospholipiden ist Glycerol mit zwei Fettsäuremolekülen und einem Molekül Phosphorsäure verestert. Letztere bildet eine weitere Esterbindung mit einem Alkohol aus. Bei den in den Membranen vorkommenden **Lecithinen** handelt es sich dabei um den Aminoalkohol **Cholin**. (▶ s. Abb. Phospholipid, S. 12)

1.3.2.3 Steroide

Obwohl sie chemisch völlig anders aufgebaut sind als Fette und Phospholipide, rechnet man die Steroide zu den Lipiden. An das polycyclische Ringgerüst Gonan (Steran) sind unterschiedliche Reste gebunden. Dadurch entstehen diverse wichtige Verbindungen wie die Hormone Östrogen und Testosteron, Vitamin D3 und der Fettbegleitstoff Cholesterol (Katzer/Katzer, Band 1, Kap. 16.5).

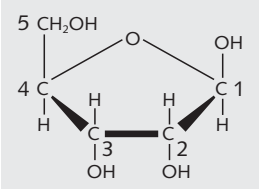
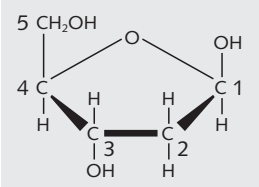
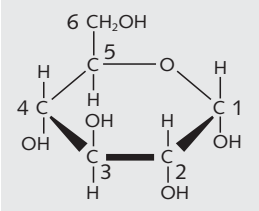


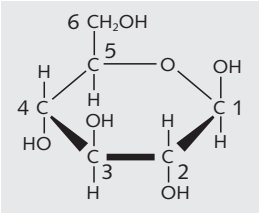
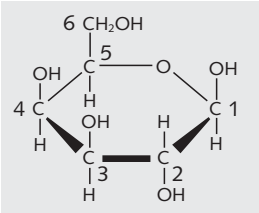
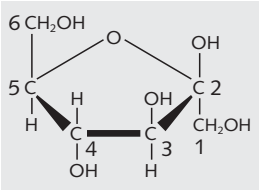
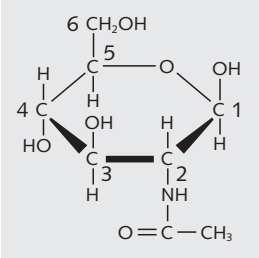
Cholesterol

1.3.3 Kohlenhydrate

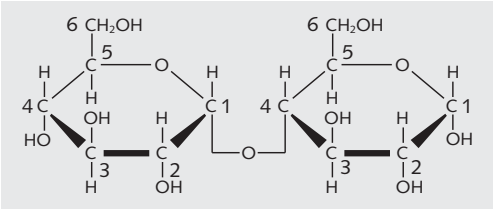
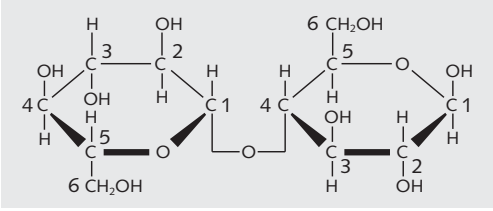
Chemisch betrachtet sind Kohlenhydrate Polyhydroxycarbonylverbindungen, die auf Grund ihrer funktionellen Gruppen untereinander und mit anderen Stoffen verbunden sein können. Dadurch entsteht eine Vielzahl biochemisch wichtiger Stoffe vom einfachen Zucker Glucose bis zu den Makromolekülen der Zellwände (Katzer/Katzer, Band 1, Kap. 16.2.13).

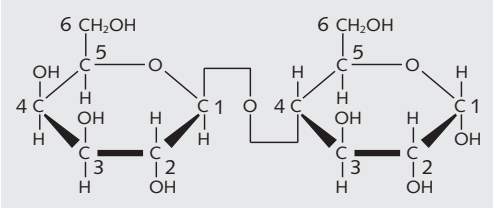
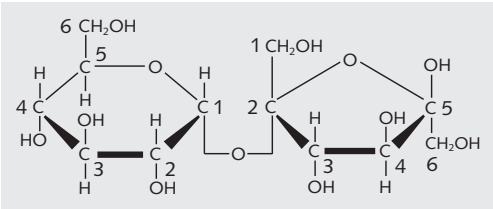
1.3.3.1 Monosaccharide

Name	Strukturformel	Besonderheiten, Vorkommen und Bedeutung
β-D-Ribose		• Aldopentose. • Bestandteil der Ribonucleinsäure RNA.
β-D-Desoxyribose		• Aldopentose. • Bestandteil der Desoxyribonucleinsäure DNA.
α-D-Glucose		• Aldohexose. • Traubenzucker. • In freier Form in vielen Früchten und im Blut (Blutzucker). • Bestandteil der Disaccharide Maltose und Saccharose sowie der Polysaccharide Stärke und Glykogen.

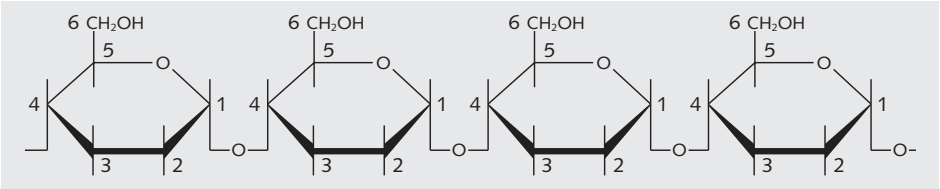
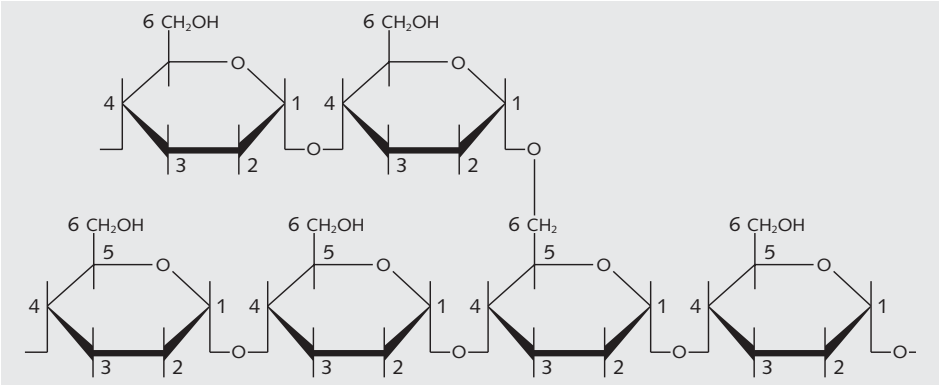
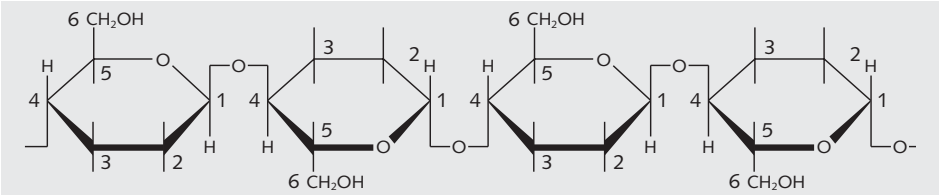
Name	Strukturformel	Besonderheiten, Vorkommen und Bedeutung
β-D-Glucose		• Aldohexose. • Traubenzucker. • Bestandteil des Disaccharids Cellobiose und des Polysaccharids Cellulose.
β-D-Galactose		• Aldohexose. • Bestandteil des Disaccharids Lactose (Milchzucker).
β-D-Fructose		• Ketohexose. • in freier Form in vielen Früchten (Fruchtzucker). • Bestandteil des Disaccharids Saccharose. • Verwendung als Süßungsmittel.
β-N-Acetyl-glucosamin		• Aminozucker. • Bestandteil von Chitin und Murein und der extrazellulären Matrix tierischer Zellen.

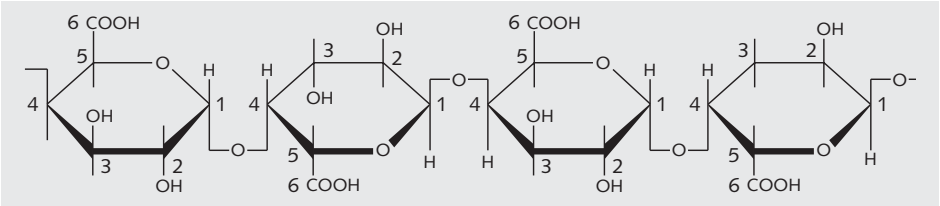
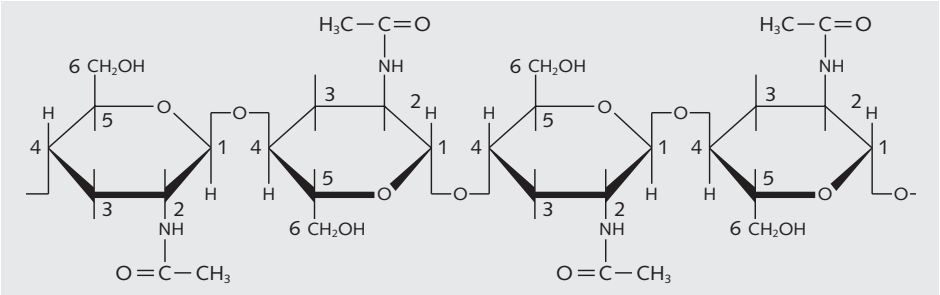
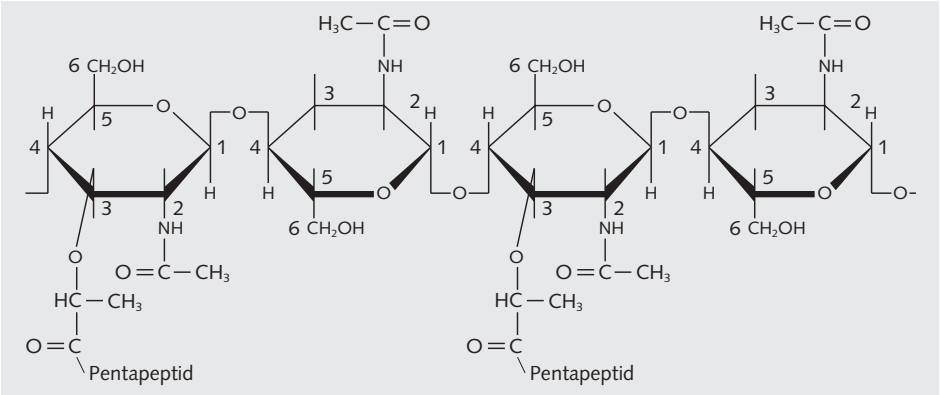
1.3.3.2 Disaccharide

Name	Strukturformel	Besonderheiten, Vorkommen und Bedeutung
Maltose		• Malzzucker. • Glucose in α-1,4-glykosidischer Bindung. • Entsteht durch enzymatischen Abbau von Stärke bei der Verdauung und beim Bierbrauen.
Cellobiose		• Glucose in β-1,4-glykosidischer Bindung. • Baustein der Cellulose, • kommt in freier Form nicht vor.

Name	Strukturformel	Besonderheiten, Vorkommen und Bedeutung
Lactose		• Milchzucker. • β-Galactose und Glucose in 1,4-glykosidischer Bindung. • Bestandteil der Milch aller Säugetiere. • Wird von bestimmten Bakterien wie z. B. Milchsäurebakterien abgebaut.
Saccharose		• Rohrzucker. • α-Glucose und β-Fructose in 1,2-glykosidischer Bindung. • Wichtigstes Disaccharid. • Kommt vor allem in Zuckerrohr und Zuckerrüben vor.

1.3.3.3 Polysaccharide

Name	Strukturformelausschnitt Besonderheiten, Vorkommen und Bedeutung
Stärke	 Amylose: Glucose in α-1,4-glykosidischer Bindung, schraubige Struktur, in deren Hohlraum sich elementares Iod einlagern kann und dadurch eine Blaufärbung erzeugt.  Amylopektin: durch 1,6-glykosidische Bindungen entstehen Verzweigungen.
Cellulose	 Glucose in β-1,4-glykosidischer Bindung, faserige Struktur, Baustoff pflanzlicher Zellwände.

Name	Strukturformelausschnitt Besonderheiten, Vorkommen und Bedeutung
Glykogen	• Aufbau wie Amylopektin, aber höhere Molmasse. • Reservestoff in Leber und Muskel, daher als „tierische Stärke“ bezeichnet.
Pektin	 • α-D-Galakturonsäure in α-1,4-glykosidischer Bindung. • Primäre Hydroxylgruppe am 6. C-Atom der Galactose zur Carboxylgruppe oxidiert, deshalb als saures Polysaccharid bezeichnet. Ein Teil der Carboxylgruppen ist mit Methanol verestert. • Hauptbestandteil der Mittellamelle pflanzlicher Zellen.
Chitin	 • N-Acetyl-glucosamin in β-1,4-glykosidischer Bindung. • Baustoff der Zellwände von Pilzen und des Außenskeletts von Insekten und Krebsen.
Murein	 • N-Acetyl-glucosamin und eines seiner Derivate, das N-Acetylmuraminsäurepentapeptid in β-1,4-glykosidischer Bindung. • Baustoff der Zellwände von Bakterien.

1.3.4 Nucleinsäuren

Die langen Stränge der Nucleinsäuren entstehen durch fortlaufende Veresterung der Pentosen Desoxyribose bzw. Ribose mit Phosphorsäure. An das erste C-Atom der Pentose ist jeweils eine der Stickstoffbasen Adenin, Guanin, Cytosin und Thymin bzw. Uracil geknüpft, deren Reihenfolge maßgeblich die Erbinformation bestimmt. Während die RNA (= Ribonucleinsäure) der Organismen einzelsträngig vorliegt, werden durch Wasserstoffbrücken zwischen den Basen der DNA (= Desoxyribonucleinsäure) Doppelstränge ausgebildet.

Den biologischen Prozessen und den molekularbiologischen Arbeitsmethoden ist das ► Kapitel 7, S. 101, gewidmet.

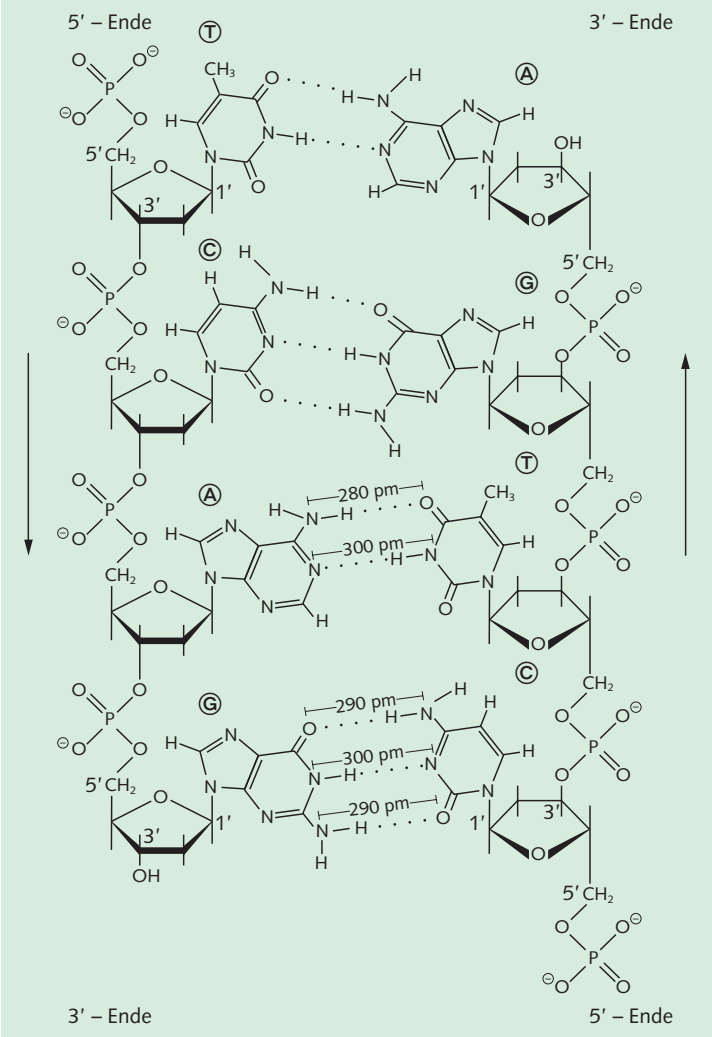


Abb. 1.5 Ausschnitt aus einem DNA-Doppelstrang

1.4 Mikroskopische Untersuchung von Zellen

Das menschliche Auge kann zwei Objektpunkte nur dann getrennt wahrnehmen, wenn sie mindestens 0,1 mm voneinander entfernt sind. Um die feinen Strukturen von Zellen zu untersuchen, bedient man sich daher verschiedener mikroskopischer Techniken.

1.4.1 Lichtmikroskopie

1.4.1.1 Vergrößerung und Beleuchtung

Das von einer Lampe ausgehende Licht wird mit Hilfe der Beleuchtungsoptik auf den Objektträger geführt und trifft bei Durchlichtbetrachtung von unten auf das Präparat, dessen mikroskopisch kleine Strukturen untersucht werden sollen. Der Betrachter blickt nun von oben durch ein Linsensystem im Tubus, das ein stark vergrößertes Bild des Objekts erzeugt. Dabei erfolgt die Vergrößerung in zwei Stufen:

- das Objektiv erzeugt wie ein Diaprojektor ein vergrößertes, reelles Zwischenbild,
- das Okular vergrößert dieses wie eine Lupe weiter zum virtuellen Endbild.

Die Gesamtvergrößerung V errechnet sich durch Multiplikation der Einzelvergrößerungen von Objektiv V_{Ob} und Okular V_{Ok} und beträgt maximal 1500.

$$V = V_{Ob} \cdot V_{Ok}$$

Die Qualität des Zwischenbildes bestimmt dabei letztlich die förderliche Gesamtvergrößerung, denn die Anzahl der Bildpunkte lässt sich durch die Lupenvergrößerung nicht mehr steigern. Wie beim Betrachten eines Bildes in einer Zeitung mit einer Lupe entsteht eine **leere Vergrößerung** ohne zusätzliche Bildinformation.

Genau so wichtig wie die Abbildungsoptik aus Objektiv und

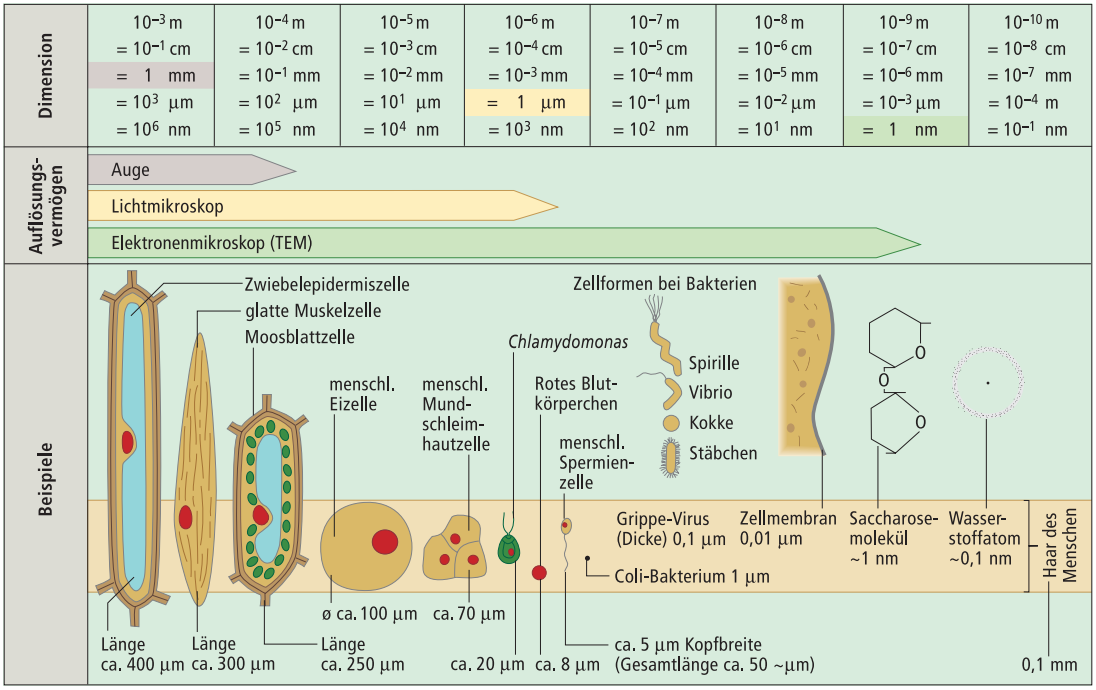


Abb. 1.6 Größenvergleich von Atomen, Molekülen und Zellen

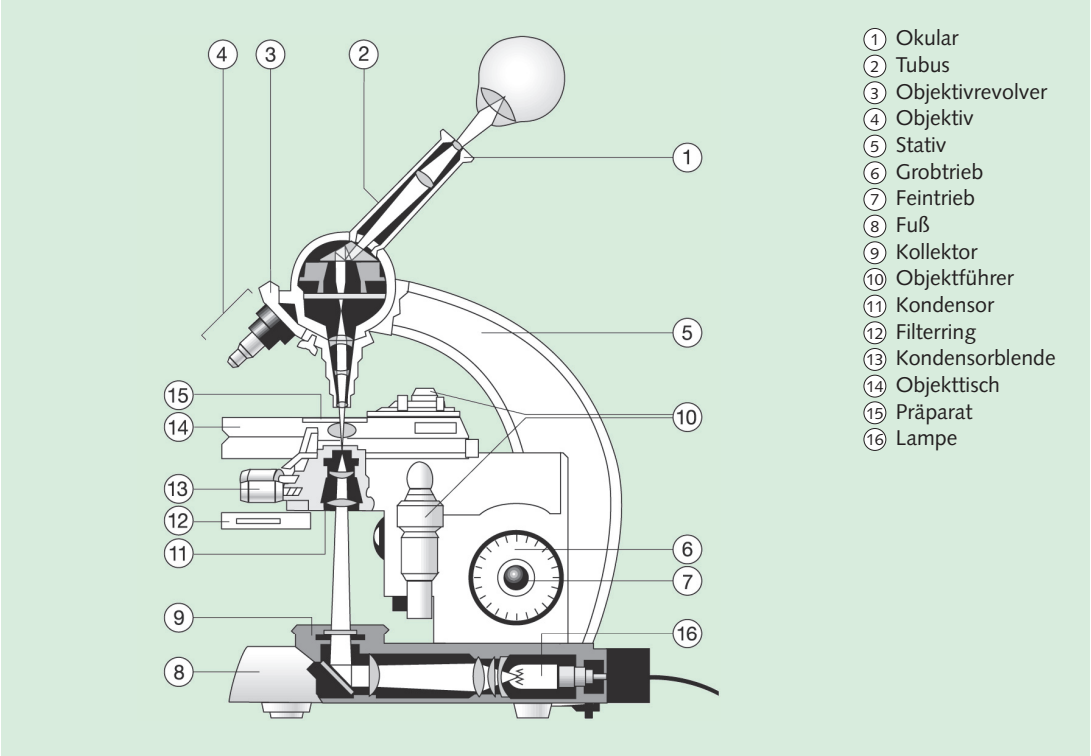


Abb. 1.7 Aufbau eines Lichtmikroskops

Okular ist aber für ein Mikroskop die Beleuchtungsoptik, die der optimalen Ausleuchtung des Objekts dient. Bei der **Köhlerschen Beleuchtung** wird das Bild der Lichtquelle von einem Linsensystem, dem Kollektor, vergrößert und auf ein weiteres Linsensystem, den Kondensor, projiziert. Dieser sorgt dafür, dass das Präparat mit einem optimalen Öffnungswinkel gleichmäßig durchstrahlt wird. Mit Hilfe der Kondensorblende oder Aperturblende lässt sich dieser Öffnungswinkel stufenlos verändern.

Bei einem Lichtmikroskop üblicher Bauweise wird das Objektiv so dicht an das Objekt herangeführt, dass zwischen Linsensystem und Präparat nur ein schmaler Spalt bleibt. Will man aber Zellen untersuchen, die sich nicht auf einem flachen Objektträger, sondern in einer Kulturschale mit Nährlösung befinden, so reicht der Platz zwischen Objekttisch und Objektiv für das Gefäß nicht aus.

Bei einem **Inversmikroskop** oder **Umkehrmikroskop** dagegen ist die Anordnung von Beleuchtungssystem und Objektivrevolver vertauscht. Der Objektivrevolver befindet sich dicht unter dem Objekttisch und führt zu einem seitlich angebrachten Okular, während Lampe und Kondensor in größerem Abstand über dem Präparat angebracht sind. Das Präparat wird also von oben durchstrahlt und gewissermaßen von unten betrachtet.

Die Bildqualität wird aber nicht nur durch die **Vergrößerung** bestimmt, sondern ist von zwei weiteren Faktoren abhängig: der **Auflösung** und dem **Kontrast**.

1.4.1.2 Auflösung

Als **Auflösungsvermögen** bezeichnet man den kleinsten Abstand *d*, den zwei Punkte eines Objekts haben dürfen, um gerade noch getrennt wahrgenommen zu werden. Dieser Mindestabstand ergibt sich nach Berechnungen des Physikers Abbé aus der Formel

$$d = \frac{\lambda}{n \cdot \sin\alpha}$$

Dabei ist λ die Wellenlänge des Lichtes, *n* der Brechungsindex des Mediums zwischen Objekt und Frontlinse und α der halbe Öffnungswinkel des Objektivs. Das Auflösungsvermögen ist daher umso besser, je kleiner die Wellenlänge des Lichtes, je größer $\sin\alpha$ und je größer der Brechungsindex des Mediums zwischen Präparat und Linse ist. Da bei der Nutzung von weißem Licht eine Verringerung der Wellenlänge nicht realisierbar ist, lässt sich das Auflösungsvermögen im Wesentlichen durch die beiden folgenden Faktoren steigern:

- Verwendung eines Objektivs mit optimalem Öffnungswinkel,
- Einsatz eines Mediums mit hohem Brechungsindex.

Die vom Objekt ausgehenden Lichtstrahlen treffen in einem Winkel α auf die Frontlinse des Objektivs. Für die Berechnung des Auflösungsvermögens ist aus physikalischen Gründen der halbe Öffnungswinkel, d. h. der Winkel zwischen den äußersten Lichtstrahlen, die gerade noch ins Objektiv eintreten können, und der optischen Achse maßgeblich. Das Produkt $n \cdot \sin\alpha$ wird als **numerische Apertur** bezeichnet (lat. *apertura*, Öffnung) und stellt eine wichtige Kenngröße jedes Objektivs dar.

Tritt Licht vom Präparat durch das Deckglas in das optisch dünnere Medium Luft über, so wird es vom Einfallslot weg gebrochen und erreicht das Objektiv (Trockenobjektiv) unter Umständen nicht mehr. Gibt man aber einen Tropfen eines speziellen Öls auf das Präparat (mit oder ohne Deckglas) und taucht die Frontlinse des Objektivs (Immersionsobjektiv) ein, so findet diese störende Ablenkung des Lichts nicht mehr statt. Beim Mikroskopieren mit **Ölimmersion** (lat. *immersio*, Eintauchen) lässt sich also eine höhere Auflösung erzielen.

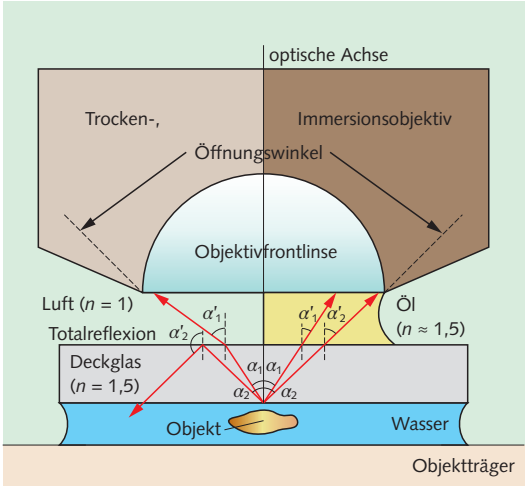


Abb. 1.8 Numerische Apertur, links Trocken-, rechts Ölimmersionsobjektiv

1.4.1.3 Kontrast

Da lebende Zellen für das sichtbare Licht weitgehend transparent sind, heben sie sich nur kontrastarm von ihrer Umgebung ab. Färbungen machen sie zwar sichtbar, führen aber gleichzeitig zu ihrem Tod.

Eine Möglichkeit zur Beobachtung lebender ungefärbter Zellen wird durch das **Phasenkontrastverfahren** gegeben.

Zu seinem Verständnis muss man die Wellennatur des Lichts heranziehen:

- Treten Lichtwellen von einem optisch dünneren in ein optisch dichteres Medium ein, so werden sie gebremst und in ihrer Phase verschoben.
- Treffen Lichtwellen auf ein Hindernis, so weichen sie von ihrer ursprünglichen Ausbreitungsrichtung ab, ein Phänomen, das man in der Optik als Beugung bezeichnet.
- Überlagern sich mehrere Lichtwellen gleicher Wellenlänge, so können sie sich gegenseitig auslöschen oder verstärken, ein Vorgang den man in der Physik als Interferenz bezeichnet.

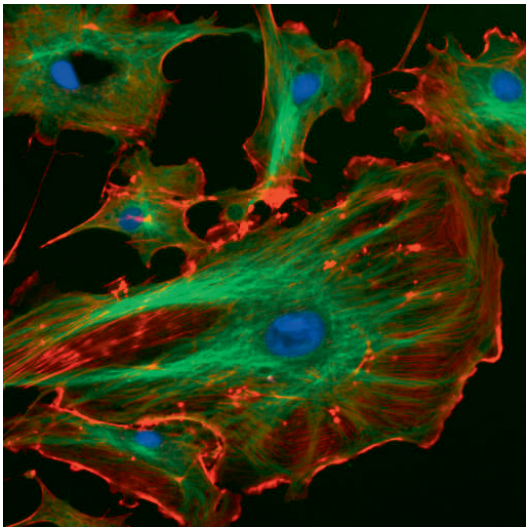


Abb. 1.9 Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme von Endothelzellen. Zellkerne und Proteine des Cytoskeletts sind unterschiedlich angefärbt.

Bei der Bildentstehung im Mikroskop trifft Licht von unten durch den Kondensor auf das Objekt. Während ein großer Teil des Lichts das Präparat ungebremst durchstrahlt, wird ein kleinerer Teil an den Strukturen des Präparates gebeugt und etwa um $\lambda/4$ verzögert. Die Wellen des ursprünglichen Lichts und des gebeugten, verzögerten Lichts überlagern sich, d. h. sie interferieren und erzeugen das reelle Zwischenbild. Der geringe Phasenunterschied reicht aber für ein deutliches Bild nicht aus. Aus physikalischen Gründen entsteht eine kontrastreiche Abbildung erst dann, wenn der Phasenunterschied $\lambda/2$ beträgt.

Im Phasenkontrastmikroskop sorgen zwei wichtige Bauteile für eine Vergrößerung des Phasenunterschiedes.

- Durch eine Ringblende am Kondensor wird das Licht in Form eines Hohlkegels auf das Objekt geleitet.
- Im Tubus ist ein Phasenring aus höher brechendem, Licht absorbierenden Material angebracht, der das ursprüngliche Licht erheblich bremst, während das gebeugte Licht weitgehend unbeeinflusst bleibt.

Durch diese Maßnahmen wird insgesamt eine Phasenverschiebung auf die halbe Wellenlänge erreicht, sodass ein kontrastreiches Bild entsteht.

Abb. 1.10 Zellen von *Bacillus subtilis*, z. T. mit Sporen, 1600-fach
Links im Hellfeld, rechts im Phasenkontrast

1.4.1.4 Fluoreszenzmikroskopie

Natürliche Zellinhaltsstoffe wie das Chlorophyll in Pflanzen lassen sich durch Bestrahlung mit energiereichem UV-Licht anregen und geben diese Energie in Form von Licht größerer Wellenlänge wieder ab: sie fluoreszieren. Da aber die meisten Zellbestandteile nicht über eine solche Autofluoreszenz verfügen, muss