Anleitung für den Selbstbau einer Ussing-Kammer für Modellversuche zum Membranpotential oder für Osmoseversuche

Richard Müller [1]*

[1]Ökologische Station in der Jugendherberge Sorpesee
Am Sorpesee 7
59846 Sundern

ZUSAMMENFASSUNG

Ussing-Kammern bestehen aus zwei Halbkammern, zwischen die die zu untersuchende Membran gespannt wird. Sie sind mit minimaler Werkstattausrüstung leicht zu so geringen Kosten selbst zu bauen, dass ein ganzer Klassensatzt erschwinglich wird. Sie sind für verschiedene Experimente einsetzbar; Versuche zum Membranpotential und zur Osmose sind hier beispielhaft angeführt.

1 VORBEMERKUNGEN

Der hier dargestellte Kammertyp wurde um 1950 von dem dänischen Physiologen Hans Ussing erfunden. Er maß damit den Ionenstrom durch Epithelien, die zwischen zwei Halbkammern montiert wurden (Lindemann, 2001). Diese Kammern sind vielseitig verwendbar und werden heute im einschlägigen Lehrmittelhandel für ca. 100 Euro pro Stück angeboten. Das dürfte es den meisten Schulen unmöglich machen, sie für Schülerübungen in Klassensätzen zu kaufen. Im folgenden wird eine Methode vorgestellt, diese Kammern für einen Bruchteil des Preises selbst zu bauen. Wenn auch Ussings originale Fragestellungen üblicherweise nicht Gegenstand von Schülerexperimenten sind, lassen sich jedoch die nach ihm benannten Kammern für quantitative Osmoseversuche oder für Modellversuche zum Ruhepotential verwenden, also für Versuche, die eine wichtige Rolle im Biologieunterricht der SII spielen.

Versuche zur Veranschaulichung des Ruhepotentials finden sich schon seit längerem in der fachdidaktischen Literatur (z. B. Eckebrecht et al. 2006). Meistens werden omnipermeable Membranen wie Filterpapier verwendet oder solche, deren Permeabilität nicht definiert ist, wie Cellophan. Hilgers et al. (1994) empfehlen die Verwendung von kationenpermeablen NAFION-Membranen, wodurch der Versuch wesentlich verbessert wurde. Seit ihrer Veröffentlichung sollte die unbefriedigende Verwendung anderer Membranen für Modellversuche zum Ruhepotential aufgehört haben, was heute, 18 Jahre nach dem Erscheinen dieses Aufsatzes, immer noch nicht der Fall ist.

Während Hilgers' Kammer jedoch sehr improvisiert war, wird hier eine verbesserte Konstruktion vorgestellt, die nur wenig aufwendiger herzustellen, dafür aber dauerhafter und universeller verwendbar ist.

*r.mueller@oeko-sorpe.de

2 HERSTELLUNG DER KAMMERN UND DER ELEKTRODEN

Für den Selbstbau der Kammern wird nur eine Bohrmaschine im Bohrständer mit drei verschiedenen Bohrern und ein Lötkolben benötigt. Im Hobbykeller oder in der Werkstatt des Hausmeisters dürfte alles zu finden sein. Falls man die Endplatten selbst zuschneiden möchte, kommt noch eine Tischkreissäge (Handsäge, Bandsäge oder Dekupiersäge funktionieren natürlich auch) dazu.

Die Kammern werden aus Kunststoff gebaut. In Frage kommen Polycarbonat, Plexiglas oder PVC. Polycarbonat und Plexiglas besitzen den Vorteil der Durchsichtigkeit, PVC das der leichteren Verarbeitbarkeit. Generell lassen sich diese Kunststoffe mit Werkzeug zur Holzbearbeitung bearbeiten, wobei PVC „gutmütiger" ist, während Polycarbonat oder Plexiglas leichter splittern. Eine Schutzbrille soll während der Bearbeitung grundsätzlich getragen werden. Für alle drei Kunststoffe gibt es spezielle Kleber, ein „Alleskleber" hält hier nicht. PVC wird mit Hart-PVC-Kleber (Tangit) geklebt. Vorher steht eine gründliche Vorbehandlung mit Tangit-PVC-Reiniger an. Eigentlich ist „Reiniger" hier ein falscher Begriff. Obwohl auch Fett u.ä. entfernt wird, soll dieser Reiniger den Klebevorgang vorbereiten, indem bereits eine oberflächliche Lösung des Kunststoffes einsetzt. So werden die Molekülketten besser vernetzt. Für Plexiglas gibt es Acrylglaskleber, die unter Lichteinfluss aushärten. Hier soll das geklebte Produkt einige Stunden ins Sonnenlicht oder unter eine Leuchtstoffröhre gestellt werden. Polycarbonat (ggf. auch Plexiglas) kann mit Dichlormethan geklebt werden, was eventuell in der Chemiesammlung vorhanden ist.

Hier wird das Vorgehen bei PVC beschrieben. Für andere Kunststoffe gilt entsprechendes. Im Anhang (und auf der Internetseite `www.phytoplankton.info/membran.html`) befindet sich eine Bohrschablone, die auf Klebefolie ausgedruckt werden soll (Abb. 1(a)). Wichtig ist, beim Ausdruck mit Acrobat Reader o.ä. keine Seitenanpassungen vorzunehmen. Ein Exemplar enthält die Schablonen für 6 Kammern. Das Blatt wird so auf eine PVC-Platte geklebt (Abb. 1(b)), dass die linken und unteren Ränder der linken und unteren Schablonen genau mit dem Rand der Platte übereinstimmen, so spart man etwas Sägearbeit. Als nächstes werden die Bohrungen vorgekörnt (Abb. 1(c)). Wenn man keinen Körner hat, kann man auch einen spitzen Nagel verwenden. Mit einem leichten Hammerschlag wird das Bohrloch markiert (Achtung: bei Plexiglas oder Polycarbonat sehr vorsichtig vorgehen!). Je genauer die Körnungen sitzen, umso besser passen hinterher die

© Ökolog. Station JH Sorpesee CC-BY-NC-ND 3.0 (2012)

beiden Kammerhälften zusammen. Zu beachten ist, dass pro Kammer zwei ungebohrte und zwei gebohrte Wände benötigt werden! Als nächstes werden die Löcher gebohrt. Die Löcher in den Ecken werden mit einem 4,5 mm-Spiralbohrer (notfalls 5 mm) gebohrt, die großen Mittellöcher mit einem 15 oder 20 mm-Flachfräsbohrer (Abb. 1(d), 1(e)). Beim Bohren die Werkstücke stets gut einspannen! Grate und Unebenheiten werden mit etwas Schmirgelpapier entfernt.

Sobald alle Bohrungen fertig sind, können die Wandstücke gesägt werden. Am besten geht das auf der Kreissäge (Abb. 1(f)). Die aufgeklebte Schablone ist für Sägeblätter mit einer Dicke von 3,5 mm ausgelegt. Beim Sägen grundsätzlich nur mit dem Schiebestock arbeiten und die Finger NIE in die Nähe des laufenden Sägeblattes bringen! Jugendliche unter 18 Jahren dürfen nicht mit der Kreissäge arbeiten! Einfacher geht es natürlich, sich die Wandstücke beim Lieferanten fertig sägen zu lassen.

Die Folie wird von den gesägten Wandstücken abgezogen. Klebereste werden mit Petroleumbenzin (Chemiesammlung) oder Tangit-Reiniger entfernt.

Als nächstes werden die kurzen Rohrstücke montiert (Abb. 1(g)). Wir verwenden der Einfachheit halber PVC-Muffen, mit denen normalerweise PVC-Rohre miteinander verbunden werden. Diese Muffen können auf einer Stirnseite kleine erhabene Beschriftungen enthalten, die bei der Verklebung stören. Am besten etwas Schmirgelpapier auf eine glatte Tischfläche legen und mit dem Rohr solange in kreisförmigen Bewegungen schmirgeln, bist die Stirnseite plan ist. Auch die andere Seite kann kurz geschmirgelt werden, so hat der Kleber eine bessere Haftung. Die Seiten der Wände, auf denen die Muffen aufgeklebt werden sollen, gut mit Tangit-Reiniger saubermachen. Der Reiniger muß mit einem Tuch mit kräftigen Bewegungen aufgebracht werden. Bei richtiger Reinigung kann man, sobald der Reiniger verdunstet ist, etwas PVC mit dem Fingernagel abkratzen.

Jetzt wird die Muffe mit der Stirnseite in den Kleber getaucht, so dass etwas Kleber ringsherum haften bleibt. Sofort danach wird die Muffe mittig auf das Wandteil aufgesetzt und, ohne es zu verschieben, angedrückt. Der Kleber hat spätestens nach 4 min angezogen. Nach einer Stunde ist die Verklebung für unsere Anforderungen ausreichend fest. Die zweite Wand wird genau so auf die andere Stirnseite montiert. Am besten stellt man dabei die Kammerhälfte waagerecht auf einen Tisch und richtet die zweite Wand an einem Anschlag aus, damit die Wände parallel und fluchtend montiert werden. Jade Kammerhälfte enthält eine gebohrte und eine ungebohrte Wand (Abb. 1(h))!

Nach einer Stunde Trockenzeit wird in jede Muffe ein Loch von 10 mm gebohrt. Diese Löcher müssen sich bei der fertig montierten Kammer oben befinden.

Aus dem Dichtungsgummi wird ein Stück von 50 × 50 mm geschnitten. Eine Kammerhälfte wird mit der Wand auf das Gummistück gelegt und mit einer dünnen Kugelschreibermine o. ä. werden die Lage der Schraublöcher übertragen. Mit einem Bürolocher werden an diesen Stellen kleine Löcher gestanzt, durch die später die Schrauben gehen. In die Mitte der Gummidichtung muss ein Loch entsprechend der Wandbohrung geschnitten werden. Aus der NAFION-Membran wird ein 3 × 3 cm großes Stück geschnitten. Zwei Kammerhälften werden zu einer Kammer zusammengeschraubt (Abb. 1(i)), Membran und Dichtung werden zwischen die Kammerhälften montiert.

Für die Elektroden wird der Silberdraht alle 4 cm, der Schrumpfschlauch alle 2 und die Kabel alle 50 cm geschnitten. Jeweils ein Kabelstück wird mit einem Stück Silberdraht verlötet. Die Lötstelle wird mit Schrumpfschlauch durch Erhitzen isoliert, am anderen Ende wird der Bananenstecker befestigt.

3 VERWENDUNG FÜR MODELLVERSUCHE ZUM RUHEPOTENTIAL

Ruhepotentialmodelle beruhen darauf, dass eine Potentialdifferenz zwischen zwei verschieden konzentrierten Elektrolyten entsteht, die durch eine Membran getrennt sind. Spannt man ein Stück Filterpapier zwischen die Hälften der Ussing-Kammer und füllt KCl-Lösungen mit 0,1 Mol/l bzw. 0,01 Mol/l in die Hälften, diffundieren sowohl Kalium- als auch Chloridionen auf die Seite mit der niedrigeren Konzentration. Da die Chloridionen (mit ihrer Hydrathülle) größer sind als die Kaliumionen, sind die Kaliumionen schneller auf der anderen Membranseite. Durch den Überschuss an positiven Ladungen lässt sich jetzt eine elektrische Spannung zwischen den Kammerhälften messen. Allerdings bricht diese Spannung bald zusammen, da nun auch die Chloridionen die andere Seite erreicht haben (Abb. 3). Dieses Modell des Ruhepotentials ist unbe-

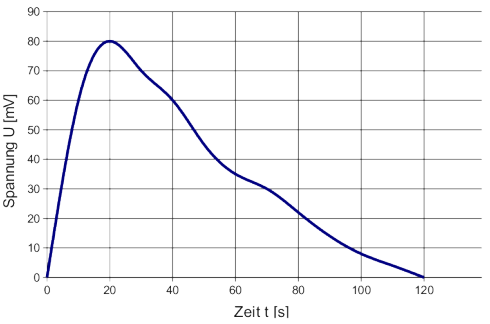
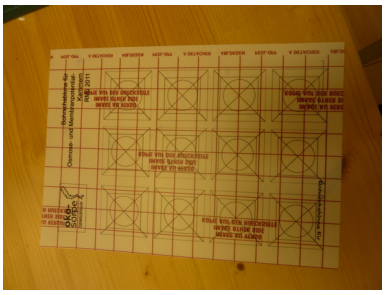


Abbildung 2. Diffusionspotential bei Verwendung einer omnipermeablen Membran

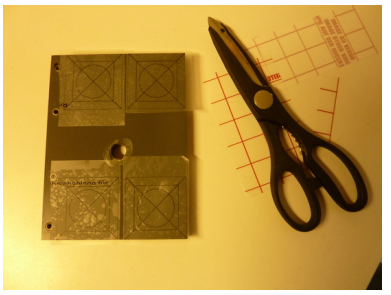
friedigend, da es nur auf der unterschiedlichen Beweglichkeit der Ionen beruht und nicht, wie bei der realen Zellmembran, auf einer selektiven Permeabilität.

3.1 Kationenpermeable Membranen

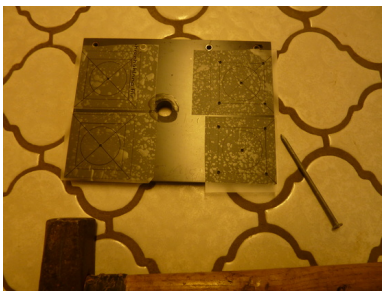
Die nur für Kationen permeablen NAFION-Membranen wurden 1962 bei DuPont erfunden. Sie werden technisch für Brennstoffzellen oder für die Herstellung von Natronlauge verwendet. Hilgers et al. erkannten ihre Eignung als Zellmembranmodell. Da hier nicht die Ionenbweglichkeit, sondern die Eigenschaft der Membran das Potential bestimmt, kommen diese Modelle der Wirklichkeit ein ganzes Stück näher. Verwendet man diese Membranen, bricht das Potential auch nicht zusammen, sondern bleibt bestehen. Auch gehorcht es der Nernst-Donnan-Gleichung. Da das durch die Chlorid-Ionen an den Elektroden hervorgerufene Elektrodenpotential die gleiche Größe hat wie das Membranpotential, kann letzteres einfach durch Division durch 2 aus dem gemessenen Potential berechnet werden. Zu beachten ist, dass durch Ungleichheiten in den Elektroden noch ein Asymmetriepotential entstehen kann. Dadurch, dass



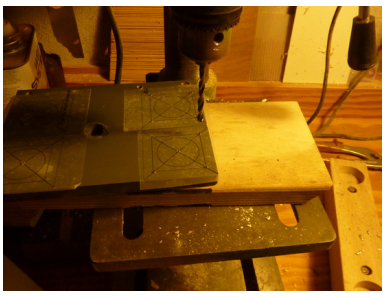
(a) Bohrschablone ausgedruckt auf Klebefolie



(b) Die Schablone wird auf die PVC-Platte geklebt

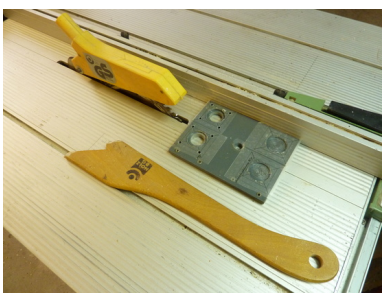


(c) Die Bohrlöcher werden angekörnt

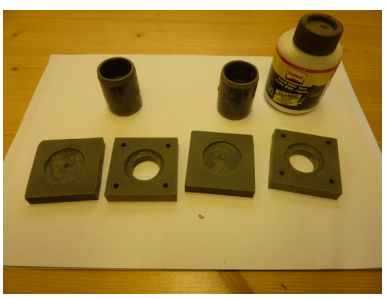


(d) Eckbohrungen der Wandstücke

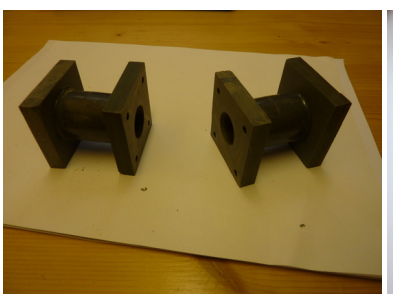
(e) Große zentrale Durchlassbohrung



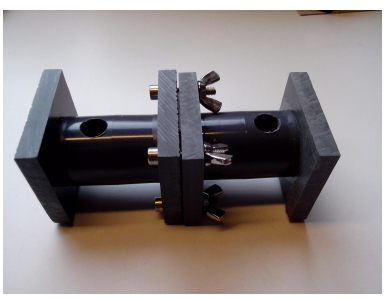
(f) Schneiden der Wandstücke auf der Kreissäge



(g) Die PVC-Teile sind fertig zur Montage



(h) Die fertig montierten Kammerhälften



(i) Die fertige Ussing-Kammer

Abbildung 1. Arbeitsschritte beim Bau der Kammern. Zu (a, b): Bei den jetzt erhältlichen Schablonen sind die einzelnen Teilstücke in Sägeblattabstand (3,5 mm) angeordnet. Zu (e, g): Die angebohrten Vertiefungen sind überflüssig und werden im Text auch nicht erwähnt.

man die Elektroden (ohne, dass sie sich berühren) gemeinsam in ein Becherglas mit KCl (c = 0,1 Mol/l) stellt, kann man das Asymmetriepotential messen und von den eigentlichen Messwerten später abziehen.

3.2 Versuchsdurchführung

Es ist entsprechend dem Aufsatz von Hilgers et al. oder Christopher (1999) vorzugehen. Die Arbeitsschritte sind auf dem beiliegenden Arbeitsblatt zusammengefasst. Die Elektroden müssen

blank sein, eine eventuelle Oxidschicht ggf. mit feinem Schmirgel entfernen. Nach Gebrauch ist die Membran wieder auszubauen und zu spülen. Hilgers et al. empfehlen eine Aufbewahrung in 2% Natriumhydrogencarbonat-Lösung, während Christopher nach dem Abspülen eine 30-minütige Regeneration in 6-molarer Salpetersäure empfiehlt, gefolgt von einer gründlichen Reinigung mit dest. Wasser und anschließender Trocknung. Vor Benutzung sollen die NAFION-Membranen 30 Minuten in Wasser eingeweicht werden.

Bei Verwendung einer Tabellenkalkulation zur Darstellung der Ergebnisse ist darauf zu achten, dass die x-Achse logarithmisch skaliert ist (Abb. 3.2).

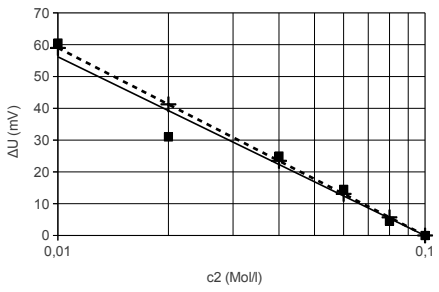


Abbildung 3. In KCl gemessene Membranpotentiale (c_1 = 0,1 Mol/l). - - + - - erwartete Werte, ——■——gemessene Werte

4 VERWENDUNG FÜR OSMOSEVERSUCHE

Bei Osmoseversuchen wird ein Stück Cellophan als semipermeable Membran zwischen die Kammerhälften montiert. Da das Cellophan unter dem Begriff „Einmachhaut“ ein Saisonartikel ist, empfiehlt es sich, sich einen kleinen Vorrat an Cellophan während der Einmachzeit zuzulegen. Manche Cellophane müssen eingeweicht werden, um ihre semipermeable Eigenschaft zu erhalten. Die beiden Kammerhälften werden mit unterschiedlich konzentrierten Zuckerlösungen gefüllt (z.B. links 0 Mol/l, also nur Wasser, rechts 0,5 Mol/l). Auf die Seite der höheren Konzentration wird unter Verwendung eines kurzen Stücks Silikonschlauchs als Dichtung eine 1 ml-Messpipette als Steigrohr eingesetzt.

5 MATERIAL UND BESCHAFFUNG

Material für 10 Stück Osmose/Membranpotential-Kammern

- 1 Platte PVC-hart Stärke min. 5 mm, Maße min. 261×208 mm (oder andere passende Maße)
- 20 Klebemuffen PVC-hart PN 16 Ø = 25mm
- 1 Dose Tangit Kleber für PVC-hart
- 40 Schrauben M4×25 (am besten Schrauben mit Innensechskant, DIN 912)
- 40 Flügelmuttern M4 (am preiswertesten „amerikanische“ gepresste Form, DIN 315)
- 40 Unterlegscheiben Ø 4,3 mm (für M4)
- Dichtungsgummi 1 mm, Zuschnitt min. 130×200 mm
- 2 A4 Transparent-Klebefolie, bedruckbar

für Osmosekammern zusätzlich:

- 1 Blatt Einmachhaut (Cellophan-Folie, keine Frischhaltefolie o.ä.!)
- 10 St. Messpipette 1 ml
- 20 cm Gummi- oder Silikonschlauch Ø 7/9 mm

für Membranpotentialkammern zusätzlich:

- NAFION-kationenpermeable Membran (NAFION 324)
- 80 cm Silberdraht Ø 0,7 mm
- Lötzinn
- 5 m Litze isoliert rot
- 5 m Litze isoliert schwarz
- 20 cm Schrumpfschlauch rot
- 20 cm Schrumpfschlauch schwarz
- 10 Bananenstecker rot
- 10 Bananenstecker schwarz
- 10 Voltmeter (Multimeter)

Benötigtes Werkzeug:

- Kreissäge
- Bohrmaschine in Bohrständer
- Spiralbohrer 4,5 mm, 10 mm
- Flachfräsbohrer 15 - 20 mm
- Hammer
- spitzer Nagel als Körner
- Schere
- Schmirgelpapier 80-100 für die Kunststoffbearbeitung
- evtl. Schmirgelpapier 600 für die Reinigung des Silberdrahtes
- Laserdrucker für Klebefolien
- Lötkolben
- Seitenschneider
- Heißluftgebläse oder Feuerzeug zum Schrumpfen des Schrumpfschlauchs

Während es früher schwierig war, einige der benötigten Teile in Kleinmengen zu erhalten, findet man mittlerweile fast alles in Ebay-Shops. Die PVC-Platten und evtl. auch die Muffen sind bei Firmen für Geräte- oder Laborbau erhältlich, die die Platten auch gleich zuschneiden können.

Problematisch ist die preiswerte Beschaffung der NAFION-Membranen. Sie sind in den Maßen 30×30 cm erhältlich beim Nafion-Store (`www.nafionstore.de`), allerdings kostet dieses Stück etwa 290 Euro. Hieraus lassen sich 100 Membranen schneiden, so dass es sinnvoll ist, wenn sich mehrere Kollegen zusammentun.

LITERATUR

CHRISTOPHER, K. (1999): Diffusion Potentials Across an Artificial Membrane. In: Tested studies for laboratory teaching. Proceedings of the 20th Workshop/Conference of the Associataion for Biology Laboratory Education (ABLE) 20, 334-342

ECKEBRECHT, H.; ECKEBRECHT, D.;, KLUGE, S. (2006): Natura. Experimentesammlung Sekundarstufe I. Stuttgart

HILGERS, U.; SCHMOLDT, S.; BLUME, R. (1994): Entstehung des Ruhepotentials - Modellversuche mit Ionenaustauschermembranen. Praxis der Naturwissenschaften/Biologie 5/43, 8-14

LINDEMANN, B. (2001): Hans Ussing, experiments and models. J. Membr. Biol. 184, 203-210