



Doctoral Thesis

## Micromanipulation of individual plant cells for qualitative and quantitative analyses

**Author(s):**

Schnorf, Martin K.

**Publication Date:**

1994

**Permanent Link:**

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-001406850> →

**Rights / License:**

[In Copyright - Non-Commercial Use Permitted](#) →

This page was generated automatically upon download from the [ETH Zurich Research Collection](#). For more information please consult the [Terms of use](#).

# MICROMANIPULATION OF INDIVIDUAL PLANT CELLS FOR QUALITATIVE AND QUANTITATIVE ANALYSES

A dissertation submitted to the  
SWISS FEDERAL INSTITUTE OF TECHNOLOGY ZÜRICH

for the degree of  
Doctor of Natural Sciences

presented by  
Martin K. Schnorf  
Dipl. Natw. ETH

born 9. November, 1965  
citizen of Uetikon (ZH)



accepted on the recommendation of

Prof. Dr. I. Potrykus, examiner  
Prof. Dr. K. Apel, co-examiner  
PD Dr. G. Neuhaus, co-examiner

Zürich, 1994

---

---

## Summary

In the past four years several methods for the functional analysis of biologically active compounds at the single cell level were established.

1) A system for single cell assays, based on protoplast microinjection, was set up. The cells are immobilized in an alginate matrix in a single focal plane and are supplied with nutrients from an underlying basislayer consisting of a solidified protoplast culture medium. Cells can be relocalized for many days with the help of gridlines in the supporting culture dish. Tobacco protoplasts regenerate with a frequency of up to 80%. About 100 cells can be injected in an hour. By injecting cloned DNA into the cells and subsequent regeneration transgenic plants were produced. The transgene is stably integrated at a high frequency (2-20%) and inherited according to the Mendelian laws.

2) While working with this system, it became clear that the reproducible delivery of a constant amount was a major limiting factor for the efficiency of the system. Since the injected volume delivered by pressure injection is mainly influenced by the injection capillary tip opening (radius in the fourth power), a method had to be established which allows the precise determination of the capillary tip diameter. A correlation was experimentally determined, relating the pressure used to force out air-bubbles from the tip into ethanol (bubble pressure) with the actual tip dimensions measured in the scanning electron microscope. The correlation can be used to determine the effective tip opening in a non destructive manner prior to the experiment. The correlation of the bubble pressure with the inner tip diameter is independent of the type of the tubing used to pull the capillary (dimensions and glass composition) as well as of the geometry of the pulled needle (shank, taper angle). The bubble pressure method allows to work with selected injection capillaries of the same physical properties. Therefore it is possible to optimize the capillary for any particular experimental need.

3) To investigate the role of cytoplasmic free calcium in the signal transduction pathway of phytochrome, photoautotrophic soybean suspension cells (SB-P cells) were injected with the fluorescent calcium indicator dye Fura-II. Therefore the alginate embedding method, developed for tobacco protoplasts (1), was modified

---

for the immobilization of SB-P cells. Embedded SB-P cells were squeezed between two cover slips to yield an appropriate thin layer of individual cells. After addition of the culture medium the alginate gelled within a few hours and the upper coverslip could be removed. Cells were injected with Fura-dextran and the fluorescence signal was recorded with an 'ATTO-Fluor' calcium imaging system. But the dye was not stably incorporated and was leaking out of the cells during the measurements. It seems that the rigid cell walls of suspension cells are not flexible enough to seal the hole produced by the injection capillary.

4) Upon these experiences a second strategy to measure cytoplasmic free calcium, independent of microinjection, was followed. The stable expression of a cDNA coding for aequorin, a calcium indicator protein, allows the measurement of calcium in a non invasive manner. Up to now, no photoautotrophic cell culture has been successfully transformed. Therefore, a transformation system for the stable transformation of SB-P cells had to be established. The delivery of cloned DNA into SB-P cells with the help of the particle inflow gun (P.I.G.) was optimized by the transient expression of GUS or LUC as visible markers. Stably transformed cell lines were recovered with the help of selectable markers. The transgene is stably integrated into the genomic DNA as was shown by Southern blot hybridization to high molecular weight DNA. Cotransformation of unlinked markers occurs at a reasonably high frequency of about 40%. The transformed cultures retain their photoautotrophic characteristics, shown by unchanged light dependent growth, chlorophyll content and CO<sub>2</sub> incorporation ability. Transformation experiments with an aequorin cDNA are currently under way.

---

## Zusammenfassung

In den letzten vier Jahren wurden verschiedene Methoden etabliert, die für die funktionelle Analyse von biologisch aktiven Substanzen in einzelnen Pflanzenzellen geeignet sind.

1) Für die Analysen an Einzelzellen wurde ein System zur Mikroinjektion von Protoplasten aufgebaut. Die Protoplasten werden dazu in einem Alginate Gel, in einer Fokussierebene eingebettet. Die Zellen werden von einem darunterliegenden, mit Agarose verfestigtem Protoplasten Medium ernährt. Injizierte Zellen können mit Hilfe eines Koordinatensystems im Boden der Kulturschalen über einen längeren Zeitraum verfolgt werden. Tabak Protoplasten regenerieren mit einer Frequenz bis gegen 80%. In einer Stunde können ungefähr 100 Zellen injiziert werden. Durch die Injektion von klonierter DNA in einzelne Tabak Zellen und nachfolgender Regeneration wurden transgene Tabak Pflanzen erhalten. Das Fremdgen wird mit einer hohen Rate von 2-20% stabil in das pflanzliche Genom integriert und nach den Mendel'schen Gesetzen vererbt.

2) Während der Arbeit mit diesem System wurde bemerkt, dass die Effizienz vorwiegend durch das schlecht reproduzierbare Injektionsvolumen limitiert war. Da das Injektionsvolumen bei der Druckinjektion vorwiegend durch den Durchmesser der Oeffnung der Nadelspitze beeinflusst wird (Radius in der vierten Potenz), musste eine Methode gefunden, werden um die Nadelöffnung präzise zu bestimmen, ohne dabei die Nadel selbst zu zerstören. Dazu wurde ein Zusammenhang des Oeffnungsdurchmessers, gemessen im Rasterelektronenmikroskop, mit dem Druck, der benötigt wird um Luftblasen aus der Nadel in Alkohol zu pressen ('bubble pressure'), erstellt. Diese Korrelation kann nun dazu verwendet werden vor jedem Experiment die effektive Oeffnung der Injektionskanüle zu bestimmen. Der Zusammenhang des 'bubble pressure' mit der effektiven Nadelöffnung ist ebenso unabhängig vom Typ der Glaskapillare, die für die Herstellung der Injektionsnadel verwendet wurde (Dimensionen, Glastype) wie auch von der Geometrie der ausgezogenen Nadel selbst. Diese Methode zur Bestimmung der Nadelöffnung erlaubt es mit einem ausgewählten Satz von Injektionskapillaren zu arbeiten, die alle dieselben physikalischen Eigenschaften

---

aufweisen. Dadurch ist es jetzt möglich die Injektionsnadel gezielt für bestimmte Anwendungen zu optimieren.

3) Um die Rolle von Kalzium in der Signaltransduktionskette von Phytochrom zu analysieren wurden Zellen einer photoautotrophen Soyabohnensuspensionskultur (SB-P Zellen) mit dem fluoreszierenden Kalzium-Indikator Fura-II injiziert. Dazu wurde die Alginateinbettungsmethode, die ursprünglich für die Injektion von Tabak Protoplasten etabliert wurde (1), für die Fixierung von SB-P Zellen modifiziert. SB-P Zellen wurden in Alginate eingebettet, zwischen zwei Deckgläser gegeben und durch Zusammendrücken der Deckgläser eine dünne, möglichst einzellige Schicht hergestellt. Nach Zugabe von Kulturmedium gelierte das Alginate innert weniger Stunden und das obere Deckglas konnte entfernt werden. Die SB-P Zellen wurden mit Fura-dextran injiziert und die Fluoreszenz mit einem 'ATTO-Fluor' Kalzium-Messsystem detektiert. Allerdings blieb der Indikator nicht stabil in den Zellen, sondern trat während der Messung aus. Es scheint, dass die starre Zellwand dieser Suspensionszellen nicht flexibel genug ist, um das Injektionsloch zu verschliessen.

4) Aufgrund dieser Erfahrungen wurde eine zweite Strategie, unabhängig von der Mikroinjektion verfolgt. Die stabile Expression einer cDNA die für das Kalzium-Indikatorprotein Aequorin codiert, erlaubt die Messung von freiem cytoplasmatischem Kalzium ohne Eingriff in die Zelle. Bis anhin wurde aber noch keine photoautotrophe Zellkultur erfolgreich transformiert. Daher musste für diese Zellen ein Transformationsprotokoll erstellt werden. Der Transfer von klonierter DNA in SB-P Zellen mit dem 'Particle Inflow Gun' kurz P.I.G. wurde mit Hilfe der transienten Expression von GUS und LUC als visuelle Marker optimiert. Stabil transformierte Zelllinien konnten mit Hilfe von selektionierbaren Markergenen erhalten werden. Wie durch 'Southern-blot' Analyse gezeigt werden konnte, wird das Fremdgen stabil in das Genom der Zellen integriert. Kotransformation von separaten Genen erfolgt mit einer Frequenz von ca. 40%. Transformierte Kulturen behalten ihre photoautotrophen Eigenschaften bei. Dies wurde durch ihr lichtabhängiges Wachstum, ihren Chlorophyllgehalt und durch ihre Fähigkeit der lichtabhängigen CO<sub>2</sub> Fixierung gezeigt. Transformationsexperimente mit einer Aequorin cDNA werden derzeit durchgeführt.