

Gefrierlagerung von Honigbienen-Ressourcen

Schritt für Schritt Anleitung

Autoren: Dr. Jakob Wegener, Victoria Viert

Eine Auflistung aller Materialien und Lösungen finden Sie am Ende der Anleitung.

Vorbereitung der Probennahme

- Zur Vorbereitung der Probennahme Versendung der Probengefäße und Dokumente
 - pro Königin einen Nicot-Versandkäfig (Best.-Nr. Holtermann 4947 o.ä.) für Ganzkörper-Präparat Arbeiterinnen, vorbereitet mit festem Futterteig,
 - pro Königin ein 50mL-Plastikgefäß (Best.-Nr. N462.1, Carl Roth, o.ä.) mit EtOH ($\geq 96\%$; Reinheit Ph.Eur. oder höherwertig) für Morphometrie)
 - Dokument „technische Anleitung zur Probennahme“
 - Dokument „Dokumentation der Probenentnahme“

Probennahme

- entnommen werden pro zu beprobendem Volk:
 - 5-10 junge Arbeitsbienen im Versandkäfig für Einlagerung in Genbank(lebend; umverpackt in 2mL Cryotube)
 - 20 junge Arbeitsbienen für Morphometrie
 - Eine ganze bis eine halbe vorzugsweise verdeckelte Drohnenwabe.
- Empfehlenswert ist der Nachweis einer gültigen Seuchenfreiheitsbescheinigung
- Die Dokumente werden eingesammelt
- Der Transport der Drohnenwabe erfolgt vorzugsweise in einem mitgeführten Bienenvolk (zweiräumig, weiselrichtig, Absperrgitter, mit Gazegitterdeckel; vorzugsweise in der oberen Zarge)

Drohnenaufzucht

- Die Drohnenaufzucht erfolgt in Ablegerbeuten in weisellosen Einheiten. Diese werden standardmäßig gebildet mit 2 verdeckelten Brutwaben und den ansitzenden sowie ca. 400g weiteren Bienen, 2 Futterwabe/Pollenwabe
- Vorzugsweise an einem schattigen Standort
- Vor Einhängen der Drohnenwabe müssen die Ableger Drohnen- und Drohnenbrutfrei gemacht werden
- Die Ablegerbeuten sind mit Absperrgitter-Böden versehen und haben ansonsten kein Flugloch, sodass die Drohnen während der Reifung kein Licht sehen
- Der Ableger sollte mit einer gekäfigten unbegatteten Königin versehen werden
- Während der Aufzucht werden die Völkchen mind. 1x wöchentlich kontrolliert. Bei Arbeitsbienen-Mangel wird verstärkt, bei übermäßigem Besatz mit Drohnen wird die Drohnenwabe vor Ende des Schlupfes aller Tiere entnommen. Das Absperrgitter unter der Beute wird regelmäßig von toten Drohnen befreit.

- Zugaben/Entnahmen von Drohnenmaterial sowie imkerliche Arbeitsschritte werden in eigenen Stockkarten der Aufzuchtvölker dokumentiert.

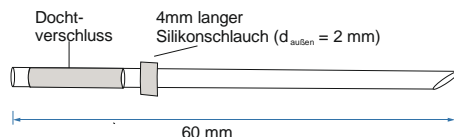
Sperma-Abnahme

- Zur Abnahme sollten die Drohnen 20-35 Tage alt sein
- Zur Abnahme wird Kiev-Puffer (Ruttner und Tryasko, 1975) verwendet.
- Von jeder Herkunft werden ca. 200 μL Sperma abgenommen.
- Das Sperma wird so schnell wie möglich, jedoch maximal 2 Tage nach der Abnahme weiter verarbeitet. Bis zur Verwendung wird es dunkel und nach Möglichkeit bei 15°C gelagert.
- Gleich beim Absamen werden folgende Proben genommen (Beispiel Deutsche Genbank Honigbiene):
 - 30 Drohnenköpfe in 0,5mL-Eppi für Genotypisierung
 - 5 μL Sperma mit 20 μL BSS (ohne Antibiotika) in 0,5 mL – Eppi für Virusuntersuchung
 - 40 Drohnenköpfe in 2 mL Cryotube für Einlagerung in Kryobank
 - 5 Drohnen in 5 mL Cryotube für Einlagerung in Kryobank
 - Alle Proben werden protokolliert und bei -80° gelagert

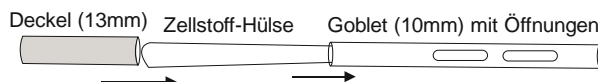
Kryokonservierung

- *Materialien:*
 - K++ - Lösung (Wegener et al., 2014); mind. 12h vor Benutzung ansetzen
 - BSS-Lösung (Wegener et al., 2014); mind. 12h vor Benutzung ansetzen und steril filtern. Kurz vor Verwendung mit 0,1% Streptomycin-Sulfat und 0,2% Penicillin-G-Kaliumsalz versetzen.
 - Mikrodialysekammern, MWCO (molecular weight cut-off) = 3.500; Carl Roth No. 4766.1; 50 min vor Verwendung mit bidestilliertem Wasser einweichen
 - Pipettierhilfe für Kapillaren (Carl Roth No. T749.1)
 - Pailletten (=Straws) 250 μL (Minitüb 13407/3010) mit Glas-Verschlusskugeln.

Die Pailletten sind vor der Benutzung wie folgt vorzubereiten:



- Goblets d = 10mm und d = 13mm. Die 13mm-Goblets sind auf 5cm Länge einzukürzen, und dienen als Deckel für die kleineren. Die 10mm-Goblets sind seitlich mit Fenstern für den einstrom von Flüssigstickstoff zu versehen und mit einer Hülse aus Zellstoff auszukleiden:



- DMSO (Carl Roth A994.2)

- Einfriergerät, Flüssigstickstoff, Dewar-Gefäß
- 100µL MicroMan-Direktverdrängungs-Pipette für Transfer des Spermas in/aus Dialysekammer/Straws
- Sperma (max. 2 Tage alt; gelagert am besten bei 15-20°C)
- zwei sterile Schnappdeckel-Gläschen 20mL
- Laborschüttler

- *Ablauf:*
 - Klimaschrank auf 22,5°C einregeln
 - DMSO-Lösung herstellen:
 - 39,5 mL BSS mit Antibiotika (0,004 g Penicillin-G-Kaliumsalz; 0,008g Streptomycin-Sulfat)
 - 10,5 mL DMSO
 - drei Straws vorbeschriften
 - Die vorbereiteten Straws mithilfe des MicroMan mit 20µL BSS (ohne DMSO) vorbefüllen; ca. 10µL Luft nachdrücken, damit das Sperma nicht direkt mit dem BSS in Kontakt kommt
 - zwei Goblets ebenso vorbeschriften
 - Die zwei Schnappdeckelgläschen mit je ca. 17mL DMSO-Lösung füllen und bei 22,5°C vorinkubieren
 - zwei Dialyse-Kammern vorweichen lassen (mind. 50 Minuten in H₂O bidest.; dieses auch in die Kammer füllen)
 - Ein 2 mL-Eppi mit 1,5 mL K++ befüllen und bei 35°C im Heizblock vorwärmen
 - Schüttler im Klimaschrank aufstellen, auf mittlere Geschwindigkeit regeln (ca. 120 U/Min.)
 - Mit MicroMan-Pipette Dialysekammer leeren und 1x mit der DMSO-Lösung durchspülen, wieder leeren
 - Mit der Pipettierhilfe das Sperma aus den Abnahme-Kapillaren („Besamungsspitzen“) in die Dialysekammer drücken. Dabei auf Blasenfreiheit achten! Dabei aus jeder Kapillare aus der Mitte der Spermasäule ca. 1µL in das vorgewärmte K++ - Eppi geben für Kontrolle der Spermaqualität „vor Einfrieren“ (s. Abschnitt „Qualitätskontrolle des Spermas“).
 - Dialysekammern mit Sperma in die vortemperierten Schnappdeckelgläschen auf den Schüttler stellen, für 32 Minuten im Klimaschrank schütteln
 - in dieser Zeit ein Dewar-Gefäß (Tiefe mind. 20 cm) mit Flüssigstickstoff füllen und Einfriergerät hochfahren und auf 20°C vorregeln
 - Sperma aus den Dialysekammern saugen, den dabei zunächst austretenden Schaum verwerfen und nur die solide Säule verwenden.
 - Sperma in die Straws drücken (mind. 2 Straws mit ca. 40µL/Straw, sowie ein Straw mit ca. 10µL für die Qualitätskontrolle nach Einfrieren), hinter das Sperma wieder 10µL Luft, sichergehen, dass die erste BSS-Portion in den Dochtabschnitt gesaugt wurde (für gasdichten Verschluss), versiegeln mit Glasperle
 - Straws in Goblets geben (Straws für die Genbank in einen Goblet und Straw mit Qualitätskontrolle in zweiten Goblet)

- Goblets in Goblet Cane stecken
- Goblets im Einfriergerät zunächst für 10 Minuten bei 20°C vortemperieren, dann für 20 Minuten mit 3 °C/Minute abkühlen (End-Temp in der Kammer -40°C). Genau nach Ende der 20 Minuten Goblet entnehmen und sofort in das Dewar-Gefäß tauchen (ganz eintauchen!).
- Goblet Canes im Lagertank einlagern

Qualitätskontrolle des Spermas

Die Qualitätskontrolle erfolgt sowohl an der Spermaprobe vor der Dialyse sowie auch an einer Kleinstprobe aufgetauten Spermas. Zum Auftauen wird die 10µL-Probe für 25 Sekunden in flüssiges Paraffinöl (35°C) getaucht.

- *Materialien:*
 - Fluoreszenzfarbstoff Hoechst33342 (Sigma Nr. B2261; Stammlösung 1mg/mL in Wasser; Kühlschrank, dunkel)
 - Propidiumjodid (Sigma P4864; fertig gekaufte Lösung mit 1 mg/mL)
 - Objektträger, Deckgläschen 18x18mm
 - Mikroskop mit PhaKo 200x sowie Fluoreszenzfiltern für die Detektion von H33342 und Propidiumjodid
 - Handzähler

- *Durchführung:*
 - Sperma mit vorgewärmter K++ -Lösung (35°C) in 2 mL-Eppi auf ca. 1µL/mL vorverdünnen
 - von dieser Verdünnung ca. 100µL in ein 0,5 mL-Eppi umfüllen und mit Farbstoffen versetzen:
 - 1µL H33342-Lösung
 - 2µL Propidiumjodid-Lösung
 - mit Pipittenspitze kurz verrühren
 - abgedunkelt im Heizblock bei 35°C inkubieren
 - Motilitätsmessung (aus dem ungefärbten 2 mL-Eppi) nach 1h
 - tot-lebend-Färbung nach 30min
 - Tot-lebend-Färbung:
 - aus dem gefärbten 0,5 mL-Eppi 8µL auf Objektträger geben, mit 18x18mm-Deckglas bedecken
 - zunächst mit Filter für H33342 die Gesamtzahl aller Zellen in einem Gesichtsfeld erfassen (Handzähler! Gesamtvergrößerung 200x)
 - anschließend für das gleiche Gesichtsfeld die Anzahl toter (=Propidiumjodid-positiver) Zellen erfassen.

- für weitere Gesichtsfelder wiederholen, bis Summe aller Gesamtzahlen > 100
- Motilitätsmessung:
 - nach mind. 1h Inkubation (max. 2h)
 - 10 μ L der Spermiesuspension aus dem 2 mL-Eppi auf Objektträger bringen und mit 18x18mm-Deckgläschen bedecken
 - zunächst in einem Gesichtsfeld alle Zellen erfassen, deren Köpfe im Feld liegen
 - anschließend für dasselbe Gesichtsfeld diejenigen Zellen erfassen, die IRGENDEINE Form aktiver Bewegung zeigen (es wird nicht unterschieden zwischen „regelrechter“ und „schwacher“ Bewegung).
 - für weitere Gesichtsfelder wiederholen, bis insgesamt >100 Zellen beobachtet wurden.

Übersicht über die für die Deutsche Genbank Honigbiene entnommenen Proben:

| Bezeichnung | Umfang | Verpackung | Zwischen- lagerung |
|--|---|--|-----------------------|
| Spermaproben | 2 x 40µL für Lagerung sowie 1 x 10µL für Qualitätskontrolle | 0,25mL-Straws; diese werden für Zwischenlagerung am LIB in 10 mm-Goblets verpackt und für die Übergabe an die Kryobank in Kassetten verpackt (Minitube Nr. 16980/0602) | LIN |
| Drohnenköpfe für Genotypisierung | 1x30 Stück | im Standard-Eppi (RNase-free; 1,5 mL) | -80°C |
| Sperma für Virus- Untersuchung | 1x10 µL, verdünnt mit 20µL BSS | im Standard-Eppi (RNase-free) | -80°C |
| Gewebeproben (Drohnenköpfe) für spätere DNA- Aufreinigung | 1x40 Stück | im 2 mL-Cryotube | -80°C |
| Ganzkörper- Proben | 1 x 5 Arbeitsbienen 1 x 5 Drohnen | im 5 mL-Cryotube | -30°C |
| Arbeiterinnen für Morphometrie | 1 x 20 Arbeitsbienen | in 50 mL-Falcon in 96% Ethanol Ph. Eur. | -30°C |

Auflistung aller Materialien und Chemikalien

Labormaterialien:

| Material | Eigenschaft/Menge/Verwendung | Quelle |
|--|--|---|
| Verdrängungspipette + Pipettenspitzen | Direktverdränger-Pipette MICROMAN® E, 10 bis 100 µl Zubehör CP-Tips für Direktverdrängerpipetten steril, 10 bis 100 µl, Passend für: M100E, Rack (2 x 96) | Best.-Nr. CTT4.1 (Carl Roth GmbH) Best.-Nr. CTX6.1 (Carl Roth GmbH) |
| Dialysekammern | ZelluTrans/Roth Mini-Dialyzer MD 100 (Einzeldialyzer im 2 ml- Reaktionsgefäß) | 4766.1 (Carl Roth GmbH) |
| Rollrandgläser (25ml) | Rollrandgläser ROTILABO® ND18/ND22, 25 ml, Höhe: 65 mm | Best.-Nr. LC85.1 (Carl Roth GmbH) |
| Reaktionsgefäß (0,5ml und 2 ml) | Reaktionsgefäße ROTILABO® 2 ml, 2 mlReaktionsgefäße ROTILABO® 0,5 ml | Best.-Nr. EA85.1 (Carl Roth GmbH) Best.-Nr. EA83.1 (Carl Roth GmbH) |
| Pipettierhilfe | Pipettierhilfe für Kapillaren | T749.1 (Carl Roth GmbH) |
| Einfrierstraws und Glasverschlusskugeln | Pailletten (=Straws) 250µL mit Glas-Verschlußkugeln. | Minitüb 13407/3010 |
| Goblets | Goblets d = 10mm; d = 13mm | Minitüb 16913/0133 Minitüb 16910/0010 |
| Probenlagertank MVE xc34/18 | Gefrierbehälter für 3.300 1/2 cc Straws (1 Level Bulk) und 630 Kryoröhrchen (1,2 ml / 2 ml) | |
| Einfriergerät | Computer Controlled Rate Freezer 14S | https://cryobiology.sylab.com/products/p/show/product/product/14-s.html |
| Dewar Gefäß | Nalgene 4150-2000 | |

Chemikalien:

| | |
|-----------------------------------|---|
| Bidestilliertes Wasser | Wasser, 10 l doppelt destilliert (3478.2 Carl Roth GmbH) |
| Glucose | D(+)-Glucose, 1 kg (X997.2 Carl Roth GmbH) |
| DMSO | Dimethylsulfoxid (DMSO), 250 ml ≥99,5 %, BioScience Grade, für die Molekularbiologie (A994.2 Carl Roth GmbH) |
| Fluoreszenzfarbstoff Hoechst33342 | Sigma Nr. B2261 |
| HEPES | N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure, Goods Puffer (9105.2 Carl Roth GmbH) |
| KCl | Kaliumchlorid, 500 g (HNO2.2 Carl Roth GmbH) |
| Na-Citrat | Tri-Natriumcitrat Dihydrat (HN12.3 Carl Roth GmbH) |
| NaH CO ₃ | Natriumhydrogencarbonat, 500 g (HNO1.1 Carl Roth GmbH) |
| Penicillin-G-Kaliumsalz | Penicillin G-Kaliumsalz, 1 g (HP49.1 Carl Roth GmbH) |
| Propidiumjodid | Sigma Nr. P4864 |
| PVP (Polyvinyl-Pyrrolidon) | Sigma P0930-50G |
| Sacharose | D(+)-Saccharose, 1 kg (4621.1 Carl Roth GmbH) |
| Streptomycin-Sulfat | Sigma S9137-25G |
| Sulfanilamid | Sulfanilamid ≥99 %, für die Biochemie (4716.1 Carl Roth GmbH) |
| Trehalose | D(+)-Trehalose Dihydrat (5151.4 Carl Roth GmbH) |

Rezepte der Lösungen:

| Lösung | Rezept |
|--|---|
| Kiev-Puffer | 2,43 g Na-Citrat 0,21 g NaHCO ₃ 0,04 g KCl 0,3 g Sulfanilamid 0,3 g Glucose Mit Bidestilliertem Wasser auf 100ml auffüllen |
| K⁺⁺ (mind. 12 h vor Anwendung) | 2,43 g Na-Citrat 0,21 g NaHCO ₃ 0,04 g KCl 0,3 g Sulfanilamid 0,3 g Glucose 3,1 g Sacharose 0,013 g PVP (Polyvinyl-Pyrrolidon) Mit Bidestilliertem Wasser auf 100ml auffüllen |
| BSS (mind. 12 h vor Anwendung, steril filtern) | 2,29 g Trehalose 0,82 g KCl 0,42 g NaH CO ₃ 4,86 g Na-Citrat 0,95 g HEPES Mit Bidestilliertem Wasser auf 200ml auffüllen |
| BSS mit Antibiotikum, Penicillin und DMSO (BSS-APD) (kurz vor der Anwendung) | 39,5 ml BSS 0,008 g Streptomycin-Sulfat 0,004 g Penecillin-G-Kaliumsalz 10,5 ml DMSO |