

Gewinnung synchron wachsender und sich vermehrender Hefezellen (*Saccharomyces cerevisiae*)

Preparation of Synchronously Growing and Multiplying Yeast Cells
(*Saccharomyces cerevisiae*)

R. Braun, W. Schmid und K. Stossek

Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Universität Marburg (Lahn)

(Z. Naturforsch. 30 c, 245–247 [1975]; eingegangen am 16. Dezember 1974)

Yeast Cells, Synchronisation, Cell Growth

From purchasable yeast small cells are prepared by repeated centrifugation. They grow and multiply in a good synchronisation.

An Hefe (*Saccharomyces cerevisiae*) lässt sich Wachstums- und Vermehrungsphase durch Wahl geeigneter Milieubedingungen, insbesondere von Substratangebot, zwar gut voneinander absetzen¹, für detaillierte Sequenzanalysen einzelner Zellkomponenten ist jedoch zusätzlich ein möglichst weitgehend synchronisiertes Zellmaterial erforderlich. Williamson und Scopes^{2, 3} haben schon 1959 ein Verfahren zur Synchronisierung von *Saccharomyces cerevisiae* erfunden, das auf die Gewinnung „großer“, vermehrungsbereiter Zellen ausgeht. Solche Zellen sind zum Studium der Vermehrungsphase selbst zweifellos gut geeignet; für die Untersuchung von Wachstum und der Vorbedingungen für die Vermehrung dürften aber „kleine“ Zellen ein günstigeres Objekt sein. Von solchen Überlegungen ausgehend wurde ein Verfahren zur Gewinnung sich synchron verhaltender kleiner Zellen ausgearbeitet. Dieses bedient sich des Prinzips der fraktionierten Zentrifugation einer Mischpopulation von Zellen und der Verarmung der erhaltenen kleinen Zellen an „Vermehrungsstoffen“. Da es vorteilhaft erschien, von leicht beschaffbarem Material auszugehen, wurde käufliche Bäckerhefe verwendet.

Methoden

I. Gewinnung „kleiner“ Zellen

Die verwendete Backhefe stammte von der Fa. Moormann, Werne/Lippe. Sie wird dort von einem diploiden Stamm gezüchtet und vermehrt. Es wurde darauf geachtet, daß zwischen Auslieferung durch den Hersteller und Abholung beim Großhändler

Sonderdruckanforderungen an Dr. R. Braun, D-3550 Marburg/Lahn, Institut für Pharmakologie, Lahnberge.

nicht mehr als 48 Stunden verstrichen. Dies war in der warmen Jahreszeit besonders wichtig. „Schmierige“ Ware wurde verworfen.

100,0 g Hefe werden in 600 ml 0,9-prozentiger Kochsalzlösung suspendiert und 2 min bei $250 \times g$ zentrifugiert (Zentrifuge Stock, Marburg). Vom Überstand (1) wird die oberste 1 cm hohe Schicht vorsichtig abgesaugt und damit ein Großteil der bakteriellen Verunreinigung und des Detritus entfernt. Dann wird vom Sediment (1) dekantiert. Der Überstand (1) wird wieder auf 600 ml aufgefüllt, ca. 30 sec bei $250 \times g$ und dann für weitere 30 sec bei $1050 \times g$ zentrifugiert. Der Überstand (2) wird abermals dekantiert und nach Auffüllen auf 600 ml 2 min bei $250 \times g$ zentrifugiert. Der erneut gewonnene Überstand (3) wird dekantiert, wobei peinlich darauf zu achten ist, daß nichts vom Sediment (3) mit übergeht, und aufbewahrt.

Das Sediment(3) wird in insgesamt 600 ml 0,9-prozentiger Kochsalzlösung aufgeschwemmt, dann wird 2 min bei $250 \times g$ zentrifugiert und der Überstand (4) wie oben sehr vorsichtig dekantiert. Sediment (4) wird verworfen.

Überstände (3) und (4) werden vereinigt und noch einmal 2 min bei $350 \times g$ zentrifugiert. Der Überstand (5) wird 10 min bei $1700 \times g$ zentrifugiert. Das nunmehr gewonnene Sediment (5) wird in wenig 0,9-prozentiger Kochsalzlösung aufgeschwemmt, dann werden die Zellen durch Filtration (Membranfilter, Porengröße 3 μm , Fa. Sartorius, Göttingen) abgetrennt.

Es werden ca. 0,7 g „kleine Zellen“ mit einem ϕ von 3,5–4 μm gewonnen. Bei Aufbewahrung im Kühlraum sind sie bis 48 Stunden nach Gewinnung für Versuche brauchbar.

II. Bestimmung der Verteilung der Zellvolumina

Die Größenverteilung der Zellvolumina wurde mit dem Celloscope 2002 (Ljungberg u. Co., Stockholm)



Dieses Werk wurde im Jahr 2013 vom Verlag Zeitschrift für Naturforschung in Zusammenarbeit mit der Max-Planck-Gesellschaft zur Förderung der Wissenschaften e.V. digitalisiert und unter folgender Lizenz veröffentlicht: Creative Commons Namensnennung-Keine Bearbeitung 3.0 Deutschland Lizenz.

Zum 01.01.2015 ist eine Anpassung der Lizenzbedingungen (Entfall der Creative Commons Lizenzbedingung „Keine Bearbeitung“) beabsichtigt, um eine Nachnutzung auch im Rahmen zukünftiger wissenschaftlicher Nutzungsformen zu ermöglichen.

This work has been digitized and published in 2013 by Verlag Zeitschrift für Naturforschung in cooperation with the Max Planck Society for the Advancement of Science under a Creative Commons Attribution-NoDerivs 3.0 Germany License.

On 01.01.2015 it is planned to change the License Conditions (the removal of the Creative Commons License condition "no derivative works"). This is to allow reuse in the area of future scientific usage.

bestimmt (Attenuatoreinstellung 1/4; Current intensity control 3,0; Discriminatoren 0 – 100. Kapillare: 80 μm ϕ).

Zur Zählung wurde die dem Versuchsansatz (s. III e) entnommene Zellsuspension 50-fach verdünnt. Während des Zählungsvorgangs wurde durch einen Magnetrührer für eine gleichmäßige Zellverteilung gesorgt. Die Bestimmungen wurden nur durchgeführt, wenn nach der mikroskopischen Beobachtung noch keine Sprossung eingesetzt hatte.

III. Bestimmung von Gesamt-RNA-DNA und -Proteinen

a. In regelmäßigen Abständen (10 oder 15 min) wurden dem Versuchsansatz 50 ml (= 0,05 g Anfangseinwaage) entnommen. Die Zellen wurden unter Eiskühlung durch ein Membranfilter (Porenweite 3 μm) abgetrennt, in ein Gläschen überführt und bei -20°C tiefgefroren. Diese Proben wurden mit 5 ml 0,6 N Perchlorsäure aufgeschwemmt und 30 min bei Zimmertemperatur gerührt. Dann wurde bei 4°C und $2000 \times g$ 20 min zentrifugiert, der Überstand abgesaugt und das Sediment durch 15-minütiges Verrühren mit einem Äther-Alkoholgemisch (1 + 2) entfettet und erneut 20 min bei $2000 \times g$ zentrifugiert. Das Sediment wurde mit 2,5 ml 0,6 M Perchlorsäure aufgerührt und 15 min bei 100°C hydrolysiert. In dem zentrifugierten Überstand wurden RNA und DNA und im Sediment das Protein bestimmt.

b. Bestimmung der Gesamt-RNA nach Barrensheen und Peham

0,2 ml des Überstandes wurden mit 0,6 M Perchlorsäure auf ein Volumen von 1 ml gebracht, mit 2 ml Orcinreagens versetzt, 20 min im Wasserbad auf 80°C erhitzt und anschließend im Eisbad abgekühlt. Messung bei 600 nm mit Zeiss-Spektrophotometer PMQ 2, Eichwert: $E = 0,1 = 10 \gamma/\text{ml}$ RNA.

c. Bestimmung der Gesamt-DNA nach Burton

2 ml des Überstandes werden mit 4 ml Diphenylaminreagens nach Burton gemischt und in verschlossenen Gläschen 18 Stunden bei 30°C gehalten. Danach Messung der entwickelten Farbe bei 578 nm. Eichwert: $E = 0,1 = 6,7 \gamma/\text{ml}$ DNA.

d. Bestimmung des Gesamt-Proteins nach Wechselbaum

Das bei a. gewonnene Sediment nach Hydrolyse wurde mit 5 ml 0,1 N Natronlauge gemischt und 30 min lang gerührt. 1 ml wurde danach mit 4 ml 0,9-prozentiger Kochsalzlösung und 5 ml Biuretreagens 30 min gerührt und anschließend zentrifugiert. Der klare Überstand wurde bei 546 nm gemessen. Eichwert: $E = 0,1 = 0,83 \text{ mg/ml}$ Gesamt-Protein.

e. Versuchsansatz: Glucose-Salzlösung nach Williamson und Scopes:

	Vitaminzusatz		
Glucose	34,0 g	Vit. B ₁	10^{-6} g/l
Ammoniumsulfat	1,98 g	Vit. B ₆	10^{-6} g/l
KCl	0,74 g	Biotin	10^{-7} g/l
MgCl ₂ · 2 H ₂ O	0,55 g		als jeweilige Endkon-
CaCl ₂ · 2 H ₂ O	0,35 g		zentration.
Na ₂ HPO ₄ · 2 H ₂ O	13,5 g		
Zitronensäure	5,04 g		
Aqua dest.	1000 ml		

Die „kleinen“ Zellen wurden 0,1-prozentig (ca. $1,5 \times 10^4/\text{mm}^3$) in 500 – 600 ml Salzlösung nach Williamson und Scopes mit einem Zusatz von 0,3% Glucose suspendiert und bei 30°C unter kräftiger Luftdurchperlung bei Vorschaltung einer Waschflasche gehalten. Nach 3 Stunden wurden als Vermehrungsfaktoren die Vitamine B₁, B₆ und Biotin zugesetzt. Wie systematische Voruntersuchungen gezeigt hatten, reichen diese bei dem hier verwendeten Hefestamm zur Einleitung der Vermehrungsphase aus. In regelmäßigen 15- oder 30-minütigen Abständen wurden aus dem Ansatzgefäß Proben entnommen und an ihnen Volumenveränderung der Zellen, Sprossungsgrad sowie die Gehalte an RNA, DNA und Protein bestimmt.

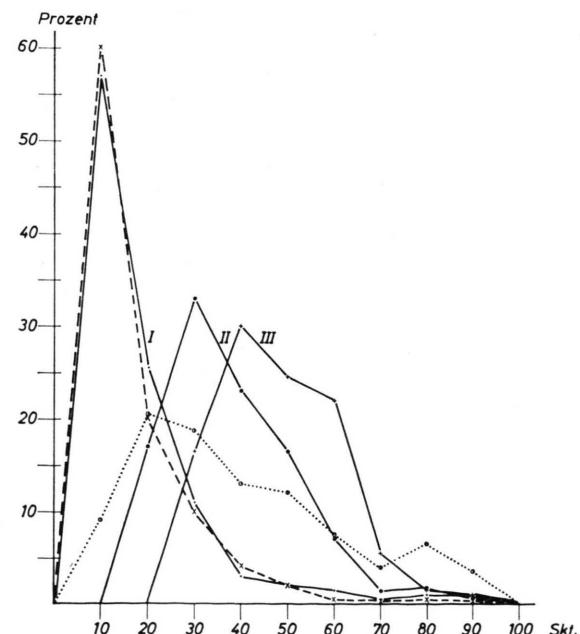


Abb. 1. Zellvolumenverteilung während der Wachstumsphase.
I. Ausgangswerte, II. nach 3 Stunden Wachstum, III. nach 3 Stunden Wachstum und 1 Stunde nach Vitaminzugabe.
..., Ausgangshefe; ——, Latexsuspension (3,5 μm ϕ).

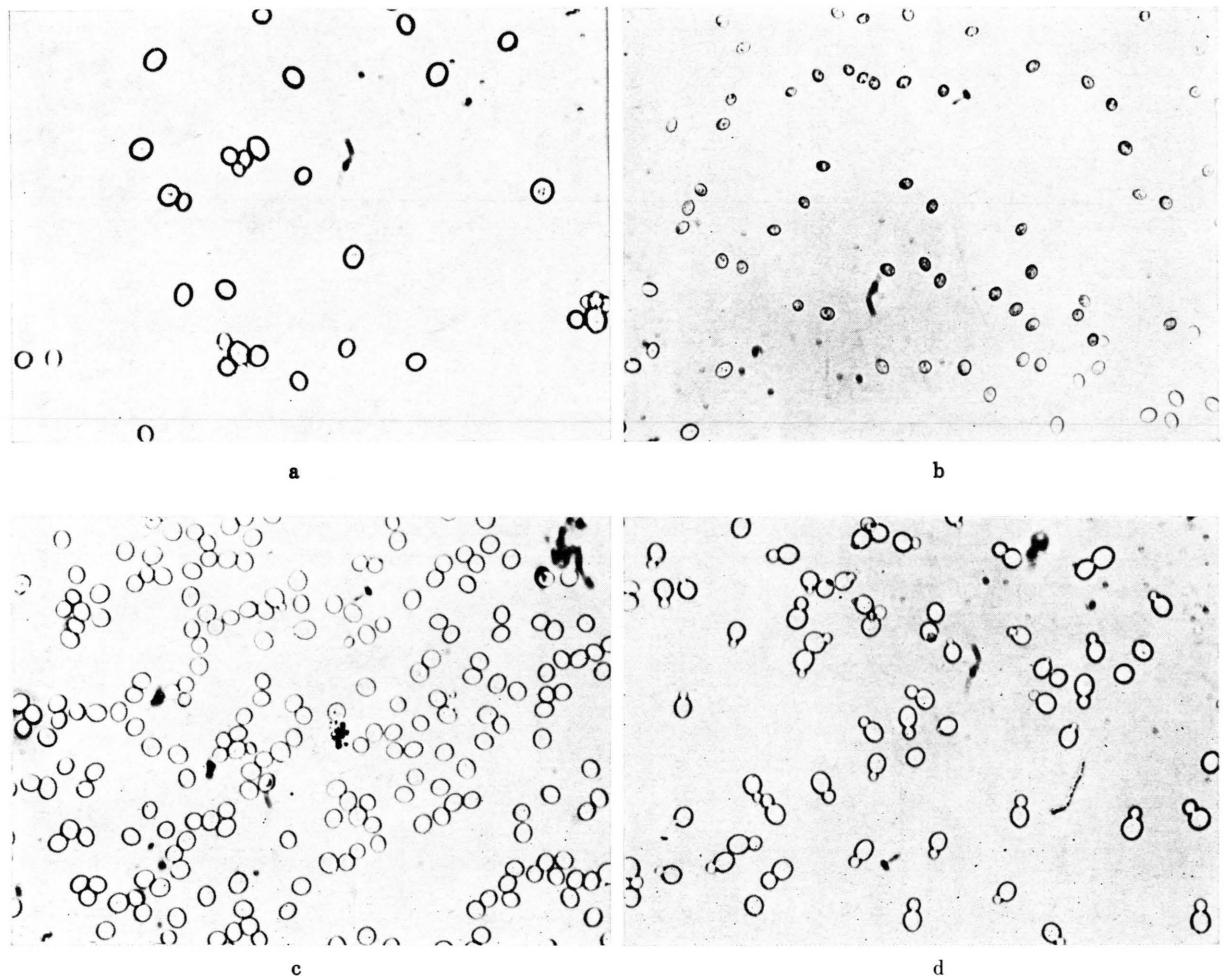


Abb. 2. Mikrofotogramme verschiedener Entwicklungsphasen (Ölimm. 100/132, Ocular 12,5), a. Ausgangshefe, b. synchronisierte „kleine“ Zellen, c. nach 3 Stunden Wachstum, d. Sprossungsstadium.

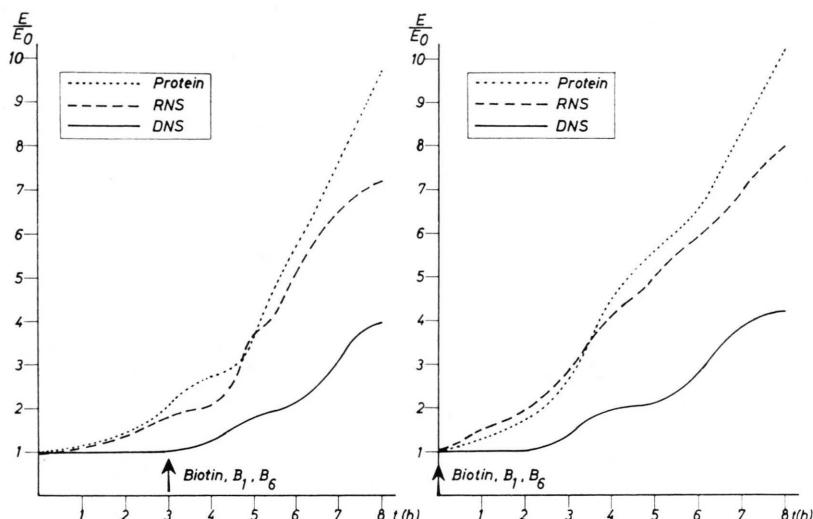


Abb. 3. Verlauf der Synthese von DNA, RNA und Protein während der Wachstums- und Vermehrungsphase. a. Vitaminzusatz in der 3. Stunde. b. Vitaminzusatz gleich zu Versuchsbeginn.

IV. Zellwachstum

Als Kriterium für ein synchrones Wachstum wurde die im Zählgerät ermittelte Verteilung der Zellvolumina in verschiedenen Zeiten nach Versuchsbeginn eingesetzt. Die „kleinen“ Zellen besitzen einen durchschnittlichen Durchmesser von $3,5 \mu\text{m}$ (Vergleichsstandard: Latexsuspension mit einem durchschnittlichen Partikeldurchmesser von $3,5 \mu\text{m}$). Ihre Verteilungskurve (s. Abb. 1) hat zu Versuchsbeginn eine sehr schmale Basis. Das Ausgangszellmaterial hat also eine ausreichend gleichmäßige Größe (s. auch Abb. 2 b *). Nach Ablauf von 3 Stunden haben die Zellen ihr Volumen etwa verdreifacht, ihr durchschnittlicher Durchmesser liegt bei etwa $5 - 5,5 \mu\text{m}$. Die Basis der Verteilungskurve ist zwar etwas breiter geworden, aus dem Kurvenverlauf selbst geht jedoch hervor, daß das Zellwachstum als gleichmäßig bezeichnet werden kann. Das gleiche ist auch noch eine Stunde nach Zugabe der Vermehrungsfaktoren der Fall; die Sprossung beträgt zu diesem Zeitpunkt etwa 1%. Der Volumenzunahme der Zellen entspricht eine Zunahme der Ribonukleinsäure- und Proteingehalte um etwa das 2- bis 3-fache (s. Abb. 3). Es liegt also ein substantielles Wachstum vor.

* Abb. 2 siehe Tafel auf Seite 246 b.

** l.c.

¹ W. Schmid, Biochem. Z. **329**, 560–567 [1958].

V. Verlauf der DNA-Synthese

Während der Wachstumsphase und auch noch in der ersten Stunde nach Zusatz der Vermehrungsfaktoren bleibt der DNA-Gehalt der Zellen konstant. Etwa 90 min nach Zugabe der Vitamine B_1 , B_6 , Biotin steigt er an und erreicht unter S-förmigem Verlauf innerhalb von 90 min etwa das Doppelte des Ausgangswertes (Abb. 3 a). Nach Stillstand der DNA-Synthese tritt ein erneuter Sprung auf das Doppelte ein (Abb. 3 b). Die Zellen zeigen also auch am Kriterium der DNA-Synthese synchrones Verhalten.

VI. Sprossung

Obwohl bei dem hier verwendeten Stamm die Abtrennung der Sprossen nicht so schnell eintrat wie bei dem von Williamson und Scopes ** beschriebenen, zeigte auch die Sprossung einen eindeutigen Gang. Sie beginnt etwa 20–30 min vor der DNA-Synthese, steigt innerhalb 60 min auf etwa 90% an und fällt vor Erreichen des neuen DNA-Plateaus auf Werte von 20–30% ab, um wieder erneut anzusteigen.

² D. H. Williamson and A. W. Scopes, Exp. Cell. Res. **20**, 338 [1960].

³ D. H. Williamson and A. W. Scopes, Nature **193**, 256–257 [1962].