

Schneller und reproduzierbarer Zellaufschluss (Bead Beating)

Dr. Tanja Hanke

Retsch GmbH

Mit der Schwingmühle bis zu 8 x 25 ml Zellsuspension zeitgleich aufschließen

Eine wichtige Methode in der biologischen Grundlagenforschung, der angewandten Biotechnologie oder medizinischen Forschung ist der Zellaufschluss von Bakterien und Hefen, um die Nukleinsäuren (DNA und RNA) oder die Zellproteine zu untersuchen. Für die Isolierung von DNA oder RNA wird meist nur eine kleine Menge Zellmaterial von unter 1 ml benötigt. Für die Extraktion von Proteinen aus Bakterien, Hefen, Pilzen oder Algen jedoch braucht man häufig größere Mengen Zellsuspension. Eine sehr effiziente Aufschlussmethode ist das sogenannte „Bead Beating“, bei dem kleine Glaskugeln in Reaktionsgefäßen Zellsuspensionen durch mechanische Effekte aufschließen. Häufig wird das Reaktionsgefäß dabei über einen Vortexer gehalten, so dass die Zellsuspension mit den Glaskügelchen im Gefäß aufgewirbelt wird und so die Zellen aufgeschert werden. Bei größeren Probendurchsätzen oder längeren Aufschlusszeiten von bis zu 10 Minuten ist diese Methode jedoch zeitaufwändig und fehleranfällig. Reproduzierbarer und schneller geht es mit einer Schwingmühle MM 400 von Retsch kombiniert mit dem Falcon-Tube Adapter, der bis zu 8 Falcons gleichzeitig fassen kann. Dies wird im Folgenden am Beispiel von Hefezellen (*Saccharomyces cerevisiae*) und Mikroalgen (*Thalassiosira pseudonana* und *Phaeodactylum tricornutum*) gezeigt.

Aufschluss von Hefesuspensionen in der Abteilung für Systembiochemie am Institut für Biochemie und Pathobiochemie der Ruhr-Universität Bochum

Die Abteilung der Systembiochemie der Ruhr-Universität Bochum beschäftigt sich mit Zellbestandteilen, den sogenannten Peroxisomen. Diese sind u.a. an Abbauprozessen von Fettsäuren in eukaryotischen Zellen beteiligt. Ist die Funktion der Peroxisomen gestört, kann das zu schweren Stoffwechselstörungen führen. Um die Funktionsweise der Peroxisomen besser zu verstehen, untersucht die Promotionsstudentin Anna Chan

Transportprozesse von Zellinhaltsstoffen in und aus den Peroxisomen am Beispiel des Modellorganismus *Saccharomyces cerevisiae*. Hierzu ist es nötig, größere Volumina von ca. 20 ml Zellsuspension aufzuschließen, um dann die Funktionalität bestimmter Zellproteine untersuchen zu können. Bisher erfolgte der Zellaufschluss im Institut durch einfaches Vortexen von jeweils 4 g Hefen mit 12 g Aufschlusspuffer und 16 g Glaskugeln (0,5 - 0,75 mm Durchmesser) im 50 ml Falcon für 12 x 1 min mit 1 min Zwischenkühlung auf Eis. Sollten mehrere Proben parallel aufgeschlossen werden, mussten viele Personen an mehreren Vortexern zeitgleich arbeiten. Außerdem war ein Wechsel der Proben zwischen den einzelnen Personen notwendig, um geräte- und personenbedingte Unterschiede auszugleichen.

Eine deutliche Arbeitserleichterung stellt für Anna Chan der Einsatz der Schwingmühle MM 400 mit dem Adapter für bis zu acht konische Falcontubes dar. Mit dieser Mühle können mehrere Proben gleichzeitig bei 30 Hz automatisiert aufgeschlossen werden. Zur Methodvalidierung verglich Frau Chan den Gesamtproteingehalt der Zellsuspension nach Vortexaufschluss mit dem nach Aufschluss mit der MM 400, ebenso wie die Temperaturentwicklung und die Reproduzierbarkeit (Abb. 1 und 2).

Bereits nach 6-7 Minuten wurde beim Zellaufschluss in der MM 400 bei 30 Hz die gleiche Menge Gesamtprotein gemessen wie nach 12 Minuten manuellem Vortex-Aufschluss. Zudem betrug der Temperaturanstieg der Zellsuspension aus der MM 400 nur etwa 8 °C gegenüber 14°C beim Vortex-Aufschluss. Der Vergleich erbrachte außerdem, dass die Methode mit der MM 400 mit einer Standardabweichung von 0,2-4 %

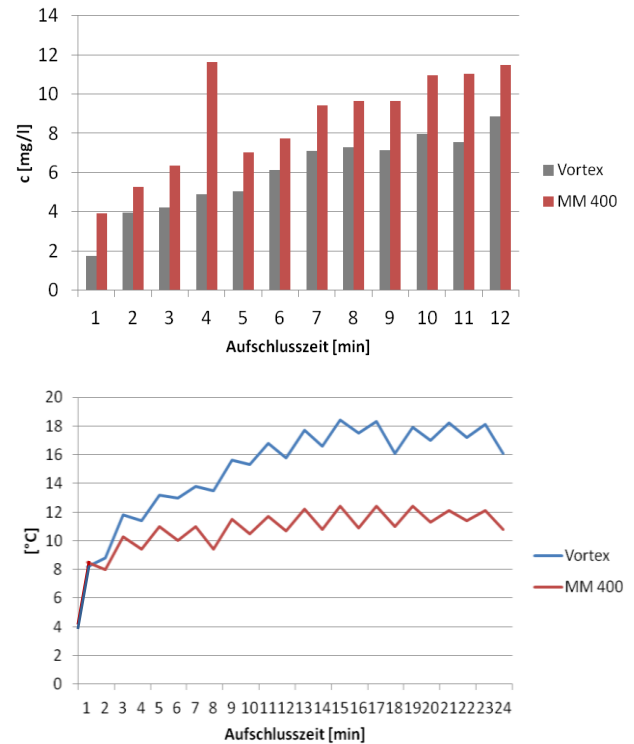


Abb. 1: Proteinkonzentration (oben) der aufgeschlossenen Zellsuspension und Temperaturentwicklung (unten) in Abhängigkeit von der Zeit

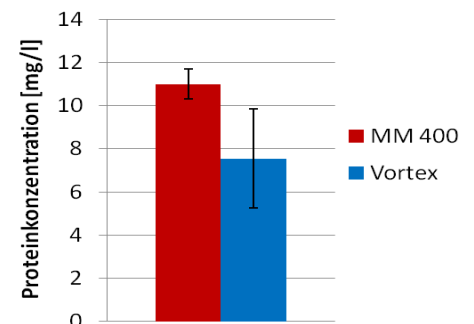


Abb. 2: Bessere Reproduzierbarkeit der gemessenen Proteinkonzentration am Beispiel Aufschlusszeit von 11 min mit der Schwingmühle MM 400 im Vergleich zum händischen Vortexen (Fehlerbalken als % Abweichung)

deutlich reproduzierbarer abläuft als das manuelle Vortexen mit einer Standardabweichung von 0,9-9%.

Wird der Aufschluss mit Glasbeads von 0,75 - 1,00 mm Durchmesser statt 0,5 - 0,75 mm Durchmesser durchgeführt, kann das zu etwas besseren Aufschlussresultaten führen. Außerdem ist es bei der Extraktion von Proteinen positiv, die Aufschlussgeschwindigkeit von 30 Hz auf 20 Hz zu reduzieren, um die Schaumbildung zu vermindern, was gleichzeitig zu höheren Mengen an Gesamtprotein in der aufgeschlossenen Zellsuspension führt, und die Temperaturerhöhung geringer hält (Abb. 3). Frau Chan konnte außerdem durch enzymatischen Aktivitätstest zeigen, dass die Proteine funktionell extrahiert werden konnten.

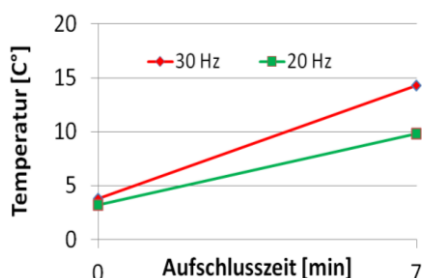


Abb. 3: Temperaturerhöhung bei Zellaufschluss mit 20 Hz oder 30 Hz, durchgehend 7 min ohne Zwischenkühlung auf Eis

Aufschluss von Mikroalgen am Institut für Molekulare Biowissenschaften, Goethe-Universität-Frankfurt

Dr. Frederik Barka erforscht am Institut für Molekulare Biowissenschaften der Goethe-Universität Frankfurt die Zusammensetzung und Funktion von Proteinen, die an der Photosynthese von Kieselalgen (Diatomeen) beteiligt sind. Der Zellaufschluss erwies sich dabei als besonders schwierig, da die Zellen dazu tendieren, bei mechanischer Beanspruchung den Scherkräften zwischen den Glasbeads stand zu halten. Der Aufschluss mit Schwingmühlen anderer Hersteller im 2 ml Maßstab war nicht erfolgreich, so dass bisher die Zellen mittels Überdruck in der French-Press aufgeschlossen werden mussten. Mit der Schwingmühle MM 400 und dem Falcontube Adapter jedoch können die Mikroalgen mittels Scherkräfte beim Bead Beating aufgeschlossen werden. 300 ml Zellkultur der Mikroalge *Thalassiosira pseudonana* wurden zentrifugiert und mit 20 ml Aufschlusspuffer im 50 ml Falcontube resuspendiert. 40 ml Glas-kugeln (90-150 µm + 300-400 µm im Verhältnis 1:1) wurden zugefügt und der Aufschluss bei 20 Hz für 20 Sekunden durchgeführt. Eine vollständige Disruption der Zellen konnte im Mikroskop gesehen werden (Abb. 4).

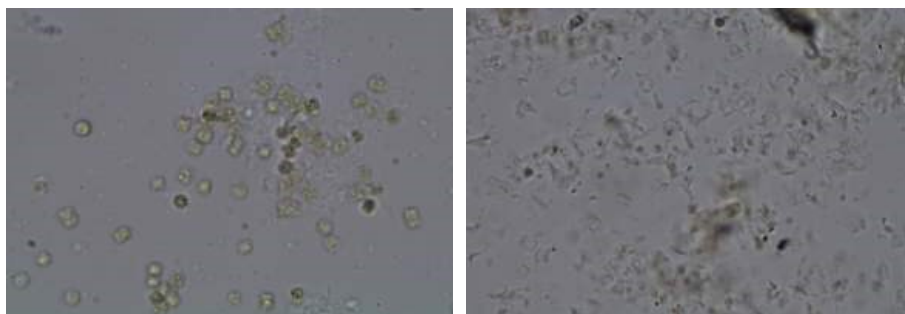


Abb. 4: Zellen der Mikroalge *Thalassiosira pseudonana* vor (links) und nach dem Aufschluss (rechts) mittels Schwingmühle MM 400 mit Falcontube-Adapter, 20 Sekunden bei 20 Hz

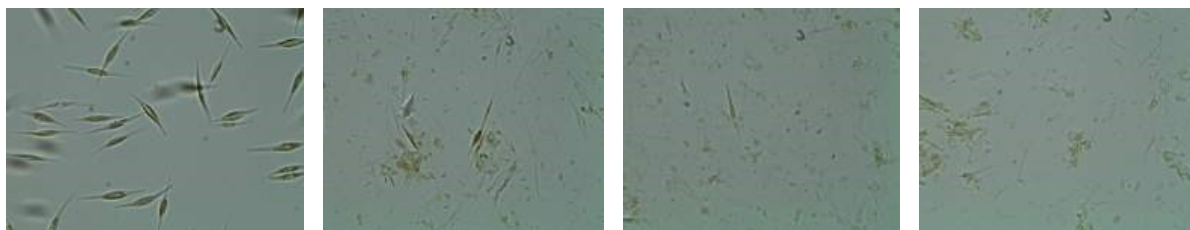


Abb. 5: Zellen der Mikroalge *Phaeodactylum tricornutum* vor (links) und nach dem Aufschluss (rechts) mittels Schwingmühle MM 400 und Falcontube-Adapter, 3 x 60 Sekunden bei 30 Hz



Abb. 6: Schwingmühle MM 400 mit Adapter für 8 x 50 ml Falcons (links) und diverses Zubehör, z.B. Adapter für Eppendorf-Tubes, Mahlbecher und Mahlkugeln (rechts)

Auch der normalerweise sehr anspruchsvolle Aufschluss von Zellen der Mikroalge *Phaeodactylum tricornutum*, welche dank fehlender Silikatschale den Scherkräften besonders gut stand halten können, gelang mit kurzem Zeitaufwand. 200 ml Zellkultur wurden zentrifugiert und mit 20 ml Aufschlusspuffer im 50 ml Falcontube resuspendiert. 40 ml Glas-kugeln (90-150 µm + 300-400 µm im Verhältnis 1:1) wurden zugefügt und der Aufschluss bei 3 x 30 Hz für 60 Sekunden durchgeführt. Eine vollständige Disruption der Zellen konnte nach insgesamt 3 min Aufschluss im Mikroskop gesehen werden (Abb. 5).

Vielseitig einsetzbar, die Schwingmühle MM 400 von Retsch

Die Schwingmühle MM 400 von Retsch ist durch umfangreiches Zubehör sehr vielseitig einsetzbar (Abb. 6), nicht nur zum Zellaufschluss in single-use Gefäßen, wie z.B. in bis zu acht 50 ml Falcons oder diversen Eppendorf Tubes (maximal 20 Proben gleichzeitig). Ganz gleich ob Pflanzen, Tannennadeln, Federn, Knochen, Gewebeproben, Tabletten, Holz, Mineralien oder Chemikalien - die MM 400 ist ein bewährter Alleskönner in der Probenvorbereitung. Sie dient zur Fein- und Feinstzerkleinerung bis 5 µm von sowohl harten, mittelharten, spröden als auch weichen, elastischen oder faserigen Proben. Die Schwingmühle zerkleinert, mischt, homogenisiert oder schließt Zellen auf. Außerdem sind die Mahlbecher aus Stahl auch zur kryogenen Zerkleinerung geeignet. Hierfür bietet Retsch das Kryokit an, indem Becher bei -196°C in flüssigen Stickstoff gekühlt und die Probe innerhalb des Bechers versprödet werden kann.