

# Isolierung und Anreicherung von Golgi-Körpern aus Reis-Keimlingen mit Hilfe der Dichtegradienten-Ultrazentrifugation

KAZUSATO OIKAWA, LAB FOR BIOMATERIAL CHEMISTRY, KYOTO, JAPAN  
SHUICHI KANI, EPPENDORF HIMAC TECHNOLOGIES, TOKYO, JAPAN  
MARK HÜNKEN, EPPENDORF SE, HAMBURG

## Einleitung

Der Golgi-Apparat eukaryotischer Zellen wurde zum ersten Mal vor 120 Jahren von Camillo Golgi beschrieben. Fortschritte in der (Elektronen-) Mikroskopie zeigten dessen komplexe Struktur auf, während weiterführende biochemische Analysen die verschiedenen Funktionen dieses Organells innerhalb der Zelle offenbarten [1].

In Zellen höherer Organismen ist der Golgi-Apparat für die Synthese komplexer Polysaccharide verantwortlich sowie für die Verarbeitung und Verteilung von Proteinen auf andere Organellen als Teil des Sekretionsweges [2].

Ein Beispiel eines solchen Proteins ist die  $\alpha$ -Amylase, eine Glykosidase, welche für die Hydrolyse von Stärkemolekülen in Pflanzen verantwortlich ist. Es wurde gezeigt, dass die  $\alpha$ -Amylase durch die Ribosomen am Endoplasmatischen Retikulum (ER) synthetisiert und innerhalb des ER-Lumens glykosyliert wird. Nachfolgend wird die  $\alpha$ -Amylase sodann zum Zwecke der Oligosaccharid-Modifikation zum Golgi-Apparat transportiert [3]. Da der Golgi-Apparat jedoch mit anderen Membransystemen, wie z.B. dem Endoplasmatischen Retikulum (ER) [1], eine komplexe Struktur bildet, ist es besonders schwierig, bestimmte Teile dieses Organells zu isolieren. In der Praxis sind Golgi-Membranfraktionen häufig mit Teilen anderer verbundener Membransysteme, wie z.B. der Vakuole, kontaminiert [1]. Die Dichtegradientenzentrifugation stellt eine der am besten etablierten Methoden zur Anreicherung von spezifischen Membranen dar [1].

In dieser Application Note beschreiben wir eine Methode, welche eine Abfolge aus differenziellem Pelletieren und Dichtegradientenzentrifugation zum Erhalt von Fraktionen der Golgi-Membran aus Reis-Keimlingen einsetzt. Die angewandte Technik erlaubt die Ernte von hochgradig reinen Extrakten von hoher Qualität zum Zwecke der nachfolgenden Analyse, wie z.B. der Massenspektrometrie.

## Material und Methoden

### Eingesetzte Materialien

Centrifuge CP80NX (Eppendorf) mit den Ausschwingrotoren P32ST für 40 mL PET-Gefäße und P40ST für 13 mL PET-Gefäße.

### Erster Schritt

Mikrosomen-Aufreinigungsprozess durch den Einsatz der Rotoren P32ST (40 mL PET-Gefäß) und P40ST (13 mL PET-Gefäß).

1. Den aufgereinigten Reis-Extrakt bei  $15.000 \times g$  für 30 min bei  $4^\circ\text{C}$  in 40 mL PET-Gefäßen in einem Ausschwingrotor zentrifugieren und das Pellet verwerfen.
2. Den Überstand von 11 mL in ein 13 mL PET-Gefäß auf 1 mL 15%iger Sucrose-Lösung über einem Kissen von 1 mL 50%iger Sucrose laden.

3. Bei  $100.000 \times g$  für 3 h bei  $4^\circ\text{C}$  zentrifugieren und sodann die auf dem 50%-Sucrose-Kissen eingeschlossene Mikrosomen-Fraktion abernten.

### Zweiter Schritt

Golgi-Aufreinigungsprozess aus der Mikrosomen-Fraktion mit Hilfe des Rotors P40ST (13 mL PET-Gefäß).

1. Die gewonnene Fraktion mit Hilfe eines 60%igen Sucrose-Puffers und eines Refraktometers auf eine 42%ige Sucrose-Dichte einstellen. Auf diese Lösung 1–2 mL eines weiteren diskontinuierlichen Sucrose-Gradienten, bestehend aus jeweils 1 mL 26%-, 30%-, 34%- und 38%-Sucrose-Schichten, laden. Vorsichtig mit Wasser auf 13 mL auffüllen.
2. Bei  $100.000 \times g$  für 3 h bei  $4^\circ\text{C}$  zentrifugieren und sodann sofort die Golgi-Fraktion (1) entnehmen, welche als Grenzphase zwischen der 34%- und der 38%-Sucrose-Schicht schwimmt.
3. Die gewonnene Golgi-Fraktion wiederum auf 42% Sucrose-Dichte einstellen und 1–2 mL auf den zweiten diskontinuierlichen Sucrose-Gradienten, bestehend aus jeweils 1 mL 26%-, 30%-, 34%- und 38%-Sucrose-Schichten, laden. Vorsichtig auf 13 mL auffüllen.
4. Bei  $100.000 \times g$  für 3 h bei  $4^\circ\text{C}$  zentrifugieren und sodann sofort die Golgi-Fraktion (2) entnehmen, welche als Grenzphase zwischen der 34%- und der 38%-Sucrose-Schicht schwimmt.

Sämtliche Sucrose-Konzentrationen beruhen auf w/w.

## Ergebnisse und Diskussion

Der Einsatz der diskontinuierlichen Dichtegradientenzentrifugation stellt eine Standardmethode zur Isolierung bzw. zur Anreicherung von subzellulären Komponenten dar. In den meisten Fällen werden die unterschiedlichen Sedimentationskoeffizienten oder spezifische Dichten herangezogen, um eine Separation zu erzielen. Die Charakteristika bezüglich dieser Parameter bei Anwendungen der Isolation von Organellen werden zum Großteil durch die Zusammensetzung der entsprechenden Membranen definiert. Eine deutliche Separation stellt häufig eine Herausforderung dar, insbesondere für Golgi-Körper, welche eng mit anderen Membransystemen verbunden sind [1]. Aus diesem Grund sind hochgradig aufgereinigte Golgi-Membranen für die Analyse und Untersuchung z.B. des Golgi-Proteoms [2] oder spezifischer Proteine innerhalb des Organells unabdingbar. Hier beschreiben wir eine effektive Methode, welche zwei verschiedene Ausschwingrotoren in Kombination mit sukzessiven diskontinuierlichen Sucrose-Gradienten-Dichtezentrifugationsschritten einsetzt, zum Erhalt von hochqualitativen Isolaten von Golgi-Körpern. Nach der Entfernung der Zelltrümmer im ersten Zentrifugationsschritt wird der Überstand auf einen ersten diskontinuierlichen Sucrose-Gradienten geladen (Abb. 1).

## Isolierung und Anreicherung von Golgi-Körpern aus Reis-Keimlingen mit Hilfe der Dichtegradienten-Ultrazentrifugation

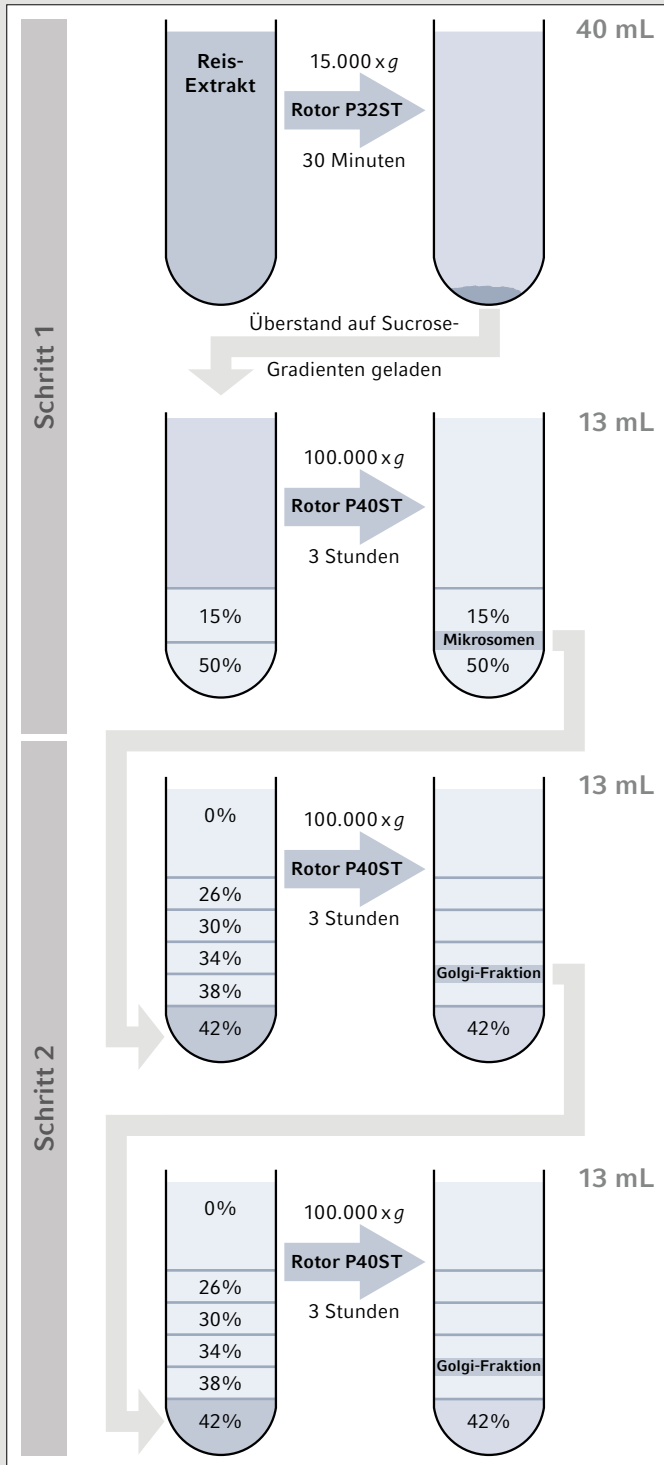


Abb. 1: Isolierung von Golgi-Körpern durch eine Folge von Zentrifugationsschritten mit diskontinuierlichen Sucrose-Gradienten

Zwischen den 15%- und 50%-Sucrose-Phasen sammelt sich eine Fraktion aus Mikrosomen an. Diese Fraktion wird zur weiteren Aufreinigung durch zwei Schritte eines diskontinuierlichen Sucrose-Gradienten eingesetzt. Hierbei sammeln sich die Golgi-Körper zwischen den 34%- und 38%-Sucrose-Phasen des Gradienten an (Abb. 2).

Asakura *et al.* [4] konnten zeigen, dass die Reinheit der Golgi-Körper-Fraktion signifikant durch den zweiten Aufreinigungsschritt verbessert wird.

Die Qualität der Golgi-Fraktion kann durch die Anwesenheit verschiedener Marker-Enzyme, wie z.B. durch die UGPase (Uridindiphosphat-Glucose-Pyrophosphorylase: Zytosol) oder die RbcL (die große Untereinheit der Ribulosebisphosphat-Carboxylase: Plastid) mit Hilfe einer Immunoblot-Analyse überprüft werden [2].

### Fazit

Die Kombination der beiden Rotoren P32ST und P40ST ist ideal zur Golgi-Isolierung. Diese Methode ermöglicht den Übergang von hohem (40 mL) zu niedrigerem Volumen (13 mL) bei hervorragender Leistung. Die besondere lange und schlanke Form der 13 mL PET-Gefäße sorgt für eine größere Trennungsdistanz, was die Reinheit der Golgi-Fraktion erhöht. Zusätzlich erleichtern die von oben beladbaren Rotor-Einsätze die schonende Handhabung der Sucrose-Gradienten und minimieren gleichzeitig das Risiko eines unbeabsichtigten Vermischens.

Download der kompletten Application Note 444:



### Literatur

- [1] Parsons H.T. *et al.* (2012): The Current State of the Golgi Proteomes, *Proteomic Applications in Biology*, Dr. Joshua Heazlewood (Ed.).
- [2] Oikawa K. *et al.* (2018), *Methods in Molecular Biology*, Chapter 6, 91-105.
- [3] Kitajima A. *et al.* (2009). *The Plant Cell*, Vol. 21: 2844-2858.
- [4] Asakura T. *et al.* (2006): *Plant Biotechnology* 23, 475-485.

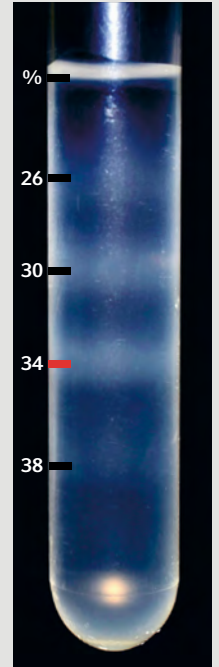


Abb. 2: Subfraktion des Golgi-Apparates aus Reis nach mehrfachen Schritten diskontinuierlicher Sucrose-Gradientenzentrifugation. Die Golgi-Fraktion zwischen der 34%- und der 38%-Sucrose-Lösung ist in Rot angezeigt

Die Eppendorf SE behält sich das Recht vor, ihre Produkte und Dienstleistungen jederzeit zu ändern. Diese Application Note kann ohne Vorankündigung geändert werden. Wenngleich größte Sorgfalt darauf verwendet wurde, die Richtigkeit und Vollständigkeit dieser Informationen zu gewährleisten, übernimmt die Eppendorf SE keine Haftung für eventuelle Fehler oder Schäden, die sich aus der Anwendung oder dem Gebrauch dieser Informationen ergeben. Die Heranziehung von Application Notes allein kann das Lesen und Einhalten der jeweils aktuellen Version der Bedienungsanleitung nicht ersetzen.