

NucleoCounter YC-100

Protokolle & Anwendungen



IUL Instruments GmbH
Königswinterer Str. 399
53639 Königswinter
Tel.: 02223-9192-0
Fax: 02223-9192-48

www.iul-instruments.de
E-mail: info@iul-instruments.de

Protokoll Nr. 300

Gesamtzellzahl-Bestimmung mit dem NucleoCounter YC-100 System

Produktbeschreibung

Das NucleoCounter YC-100 System besteht aus dem NucleoCounter YC-100 Gerät, den Einweg-Kassetten und dem Aufschlussreagenz Y100. Außerdem empfehlen wir die Verwendung der NucleoView-Software.

Der NucleoCounter YC-100 wurde als unabhängige Einheit entwickelt, aber wir empfehlen den Anschluss an einen Rechner und den Einsatz der NucleoView-Software. Dadurch können Ergebnisse abgespeichert und Daten exportiert und gedruckt werden.

Anwendungsbereich

Dieses Protokoll für das NucleoCounter YC-100 System ist für die Bestimmung der Gesamtzellzahl (volumetrische Zellzahl) von Hefeproben entwickelt worden. Es ist aufgrund der geringen Flockung besonders für den Einsatz mit Hefen geeignet. Die Analyse mittels NucleoView-Software ist zu empfehlen.

Einleitung

Biomasse und biologische Produkte, die während einer Fermentierung produziert werden, sind sowohl von der Zellzahl als auch von den physiologischen Bedingungen abhängig. Die physiologischen Bedingungen können während der Fermentierung gesteuert werden, wohingegen die Zellzahl hauptsächlich durch die ursprüngliche Zellzahl bei Prozeßbeginn gesteuert wird. Die Überwachung der Zellzahl erlaubt es den Wissenschaftlern, induzierbare Systeme zu aktivieren oder Zellen zum optimalen Zeitpunkt bei bester Ausbeute zu ernten. Auch Verfahren, bei denen transformierte Hefen verwendet werden, können von diesem System profitieren.

Die herkömmliche Methode sieht vor, dass die optische Dichte einer Suspension bei 600 nm (OD_{600}) bestimmt wird und daraus eine grobe Abschätzung der Zellzahl resultiert. Tatsächlich ist aber eine Messung des Trockengewichts (DCW) oder eine volumetrische Zellzahlbestimmung die bessere Methode, reproduzierbare Ergebnisse und damit eine Optimierung der Kultivierungsbedingungen zu erzielen.

Das NucleoCounter YC-100 System erlaubt eine genaue Zellzahlbestimmung innerhalb von Sekunden. Die Methode ist unabhängig von Zellrümern und Substratkonglomeraten im Medium, denn es basiert auf der DNA in den Zellkernen. Der NucleoCounter YC-100 ist wartungs- und kalibrierungsfrei, extrem einfach zu bedienen und besonders gut für die Routineanalyse von Hefeproben geeignet.

Wir empfehlen Ihnen, die NucleoCounter YC-100 Methode für die relevanten Hefestämme in Ihrem Labor mittels herkömmlicher Protokolle, z.B. Trockengewichtsbestimmung, Zählkammer mit manueller Zellkonzentrationsbestimmung, Durchflußzytometrie, Impedanzmessungen oder optische Dichte, zu validieren.

Grundlagen

Für die Bestimmung der Gesamtzellzahl werden die Hefezellen zunächst mit dem Aufschlussreagenz Y100 behandelt. Dieser Puffer durchdringt die Zellwand und – membran und ermöglicht damit die Anfärbung der zellulären DNA durch Propidiumiodid, welches fest gebunden in der Kassette vorliegt. Der Puffer Y100 kann kleinere Zellaggregate auflösen, aber Zellen, die sich gerade in der Teilung befinden, werden nicht dissoziiert.

Geschätzte Korrelation zwischen OD, DCW und Hefezellzahl:

1 OD₆₀₀ (1 OD gemessen bei 600 nm, im linearen Bereich)
= ca. 0,3 bis 0,6 g Trockengewicht/Liter (Trockengewicht, DCW)
= ca. 1x10⁶ bis 5x10⁶ Zellen/ml

Nach der Behandlung mit dem Reagenz Y100 (meistens weniger als 30 Sek.) werden ca. 50 µl der Zellsuspension in die NucleoCounter-Kassette aufgezogen. In diesem Magazin liegt genügend Propidiumiodid vor, um die zelluläre DNA anzufärben. Die Kassette wird in den NucleoCounter eingesetzt und die Zellen werden automatisch innerhalb von 30 Sekunden gezählt. Es wird dann eine absolute volumetrische Gesamtzellzahl angezeigt.

Korrelation zwischen OD oder DCW und volumetrischer Gesamtzellzahl:

Die Korrelation dieser Werte kann für jeden Zelltyp und –stamm in Form einer Kurve aufgezeichnet werden. Dadurch kann dann auch anhand der gemessenen Zellzahl eine geschätzte optische Dichte (OD) oder Trockengewicht (DCW) errechnet werden.

Protokoll

Protokoll für die Zellzahlbestimmung von Hefezellen in Suspension

1. Geben Sie 450 µl Reagenz Y100 in ein 1,5 ml-Polypropylenröhrchen.
2. Mischen Sie die Hefeprobe durch Umschütteln und Invertieren gründlich, um eine homogene Suspension zu erhalten. Geben Sie 50 µl dieser Probe in den vorbereiteten Puffer Y100 und vermischen Sie die Lösung gründlich durch Vortexen oder kräftiges Auf- und Abpipettieren. Das Gesamtvolumen beträgt nun 500 µl, entsprechend einer 1:10 Verdünnung. Je nach Hefestamm kann die Inkubation bis zu 10 Minuten dauern.

ACHTUNG: Ab diesem Schritt kann die Zellsuspension einige Zeit entweder im Kühlschrank oder bei Raumtemperatur gelagert werden. Allerdings muss die Probe dann immer erneut gründlich vermischt werden, ehe ein Teil entnommen oder die Kassette beladen wird. Es muss für jeden Probestyp individuell untersucht werden, wie lange dieser Lagerungsschritt dauern darf.

3. Wenn nötig können die Schritte 1-2 wiederholt werden, um einen (oder mehrere) zusätzlichen 1:10 Verdünnungsschritt zu erreichen. Für die meisten industriellen Hefefermentierungen ist eine 1:100 bis 1:1000 Verdünnung geeignet, es können aber auch andere Verdünnungen hergestellt werden. Für verschiedene Hefetypen können Inkubationszeiten von bis zu 10 Minuten nötig sein.

ACHTUNG: wir empfehlen die Verwendung von gleichen Volumina des Reagenz Y100 und Zellsuspension, um eine effektive Permeabilisierung der Zellen zu gewährleisten.

OD ₆₀₀ (optische Dichte bei 600 nm)	Empfohlene Verdünnung (geschätzt)
<0,5	5
0,5-1	10
1-5	50
5-10	100
10-15	150
15-20	200
>20	>200

Tabelle 1: Empfohlene Verdünnungswerte für die Analyse von Hefezellen mittels NucleoCounter YC-100. Diese Werte stellen lediglich ungefähre Richtwerte dar, da die optische Dichte für verschiedene Hefestämme unterschiedlich sein kann. Die obigen Zahlen basieren auf Saccharomyces cerevisiae (CEN.PK 113-7D) gemessen im linearen OD-Korrelationsbereich (siehe Abb. 1). Die Gesamtkonzentration der verdünnten Suspension sollte zwischen 1×10^5 bis 2×10^6 Zellen/ml liegen, um eine statistisch zuverlässige Zählung sicherzustellen. OD-Messungen sind geräte-spezifisch und können für verschiedene Herstellerfirmen schwanken.

4. Führen Sie die Messung der Zellen in der NucleoCassette durch. Bedenken Sie dabei bitte, dass der Verdünnungsfaktor (z.B. 100) entsprechend der Gesamtverdünnung laut obiger Tabelle in der NucleoView-Software eingestellt werden muss. Wir empfehlen den Anwendern, bei der Erstellung der Korrelationskurven jeden Hefetypus und -stamm drei mal zu messen (jeweils drei verschiedene Proben). Die OD-Messungen sind geräte-spezifisch und können von Hersteller zu Hersteller variieren.

ACHTUNG: Um eine statistisch zuverlässige Analyse zu gewährleisten empfehlen wir, die Gesamtkonzentration der verdünnten Suspension zwischen 1×10^5 bis 2×10^6 Zellen/ml einzustellen.

5. Wenn die Konzentration der Zellen in der unverdünnten Probe unterhalb von 1×10^5 Zellen/ml liegt, dann können die Zellen durch Zentrifugation angereichert werden (>10.000xg, 15 min). Danach werden die Zellen in PBS oder Nährmedium wieder aufgenommen und gezählt. Eine repräsentative Probenmenge sollte mindestens 0,5 ml vorbehandelter Zellsuspension / Röhrchen beinhalten. Der pH der vorbehandelten Zellsuspension sollte zwischen 4 und 9 liegen, damit das Propidiumiodid die DNA gut anfärben kann. Der pH des Reagenz Y100 liegt bei 7, aber er ist nicht gepuffert.

Es können dann die Daten aus der NucleoView-Software entnommen werden, indem die „export data“-Funktion verwendet wird.

Erstellung einer Korrelationskurve (optional):

Exportierte Daten können in ein Tabellenprogramm importiert werden. Dort können die Ergebnisse wie folgt aufgetragen werden:

Optische Dichte (OD₆₀₀) gegen Zelldichte (Zellen/ml) (siehe Abb. 1)

Oder

Trockengewicht (DCW) gegen Zelldichte (Zellen/ml).

Für verschiedene Hefestämme kann ein Korrekturfaktor (F) zwischen 1 und 1,5 verwendet werden, um die Werte aus der Analyse mit dem NucleoCounter YC-100 mit den Gesamt-

zellzahlen anderer, manueller Analysenmethoden zu korrelieren. Ein Teil der wachsenden Hefezellen kann Cluster aus 2 oder mehr Zellen bilden, wodurch bei manuellen Methoden eine Abweichung zu den Zahlen der einzelnen Zellen aus der NucleoCounter-Analyse entstehen kann.

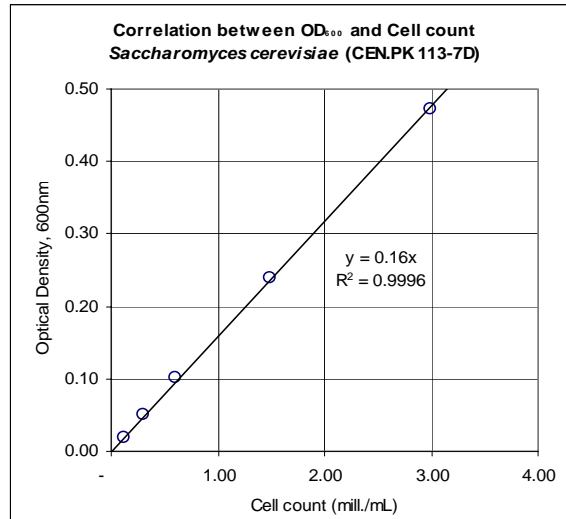


Abbildung 1: Korrelation zwischen OD₆₀₀ und Zellzahlen im linearen Bereich nach der Analyse mit NucleoCounter YC-100 (*Saccharomyces cerevisiae*, CEN.PK 113-7D). Generell sollte die optische Dichte im linearen Korrelationsbereich gemessen werden.



Abbildung 2: Unbearbeitetes Bild einer Hefesuspension (*Saccharomyces cerevisiae*), aufgenommen mit NucleoCounter YC-100 nach Vorbehandlung mit Reagenz Y100 und 100-facher Verdünnung. Die Gesamtzellzahl beträgt ca. 8×10^7 Zellen/ml. Die Partikel haben etwa gleiche Fluoreszenzintensitäten und Größe, was auf sehr geringe Zellerstörung hindeutet. Die Hefezellen sind gleichmäßig über den gesamten Aufnahmebereich verteilt. Sie können mit einem Fluoreszenzmikroskop, das mit den entsprechenden Filtern für Propidiumiodid ausgestattet ist, in der Messkammer der NucleoCassette manuell betrachtet werden.

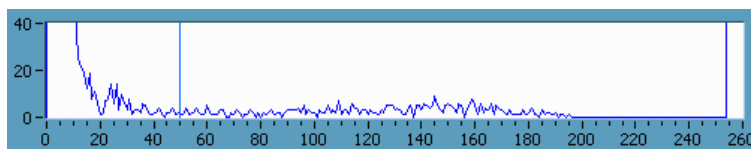


Abbildung 3: NucleoCounter YC-100 Objekt Fluoreszenzintensität aufgetragen in einem Häufigkeitshistogramm („Objekt Intensität Histogramm“). Korrekt identifizierte Objekte, die innerhalb der Grenzen des senkrechten **DISCRIMINATORS** bei 50 und dem Maximumwert bei 255 liegen, werden als Zellen gezählt. Die meisten gezählten Zellen haben in der Sättigung ein oder zwei Pixel (Daten ohne Bild). Das Zählen der Zellen in der Aufnahme durch den eingebauten Rechner erfolgt beim NucleoCounter YC-100 voll-automatisch.

ACHTUNG: Um eine statistisch zuverlässige Analyse zu gewährleisten empfehlen wir, die Gesamtkonzentration der verdünnten Suspension zwischen 1×10^5 bis 2×10^6 Zellen/ml einzustellen.

Anhang

Bestimmung der Generationsdauer (Verdoppelungszeit, g) und der mittleren Wachstumskonstante (k) für exponentielles Wachstum von Hefen

Die Vermehrung der Zellen, die in einer exponentiell wachsenden Zellkultur stattfindet, folgt einer geometrischen Reihe 2. Grades. Wegen dieser geometrischen Reihe gibt es einen direkten Bezug zwischen der Anzahl Zellen in einer Zellkultur beim Beginn ($t=0$) der logarithmischen Phase und der Anzahl Zellen nach einer Phase exponentiellen Wachstums.

$$N = N_0 \times 2^n$$

wobei N die Endkonzentration der Zellen (Zellen/ml), N_0 die Konzentration am Anfang (Zellen/ml) und n die Anzahl der Generationen (Zeit, bis die Zellzahl sich verdoppelt hat) darstellt.

Nach der Transformation ist die Anzahl der Generationen

$$n = \frac{\ln N - \ln N_0}{\ln 2}$$

Die Generationsdauer oder Verdoppelungszeit g wird definiert als

$$g = \frac{t}{n}$$

und daraus folgt

$$g = \frac{t \times \ln 2}{\ln N - \ln N_0}$$

wobei t die Zeitdauer exponentiellen Wachstums zwischen zwei Messungen darstellt (in Minuten min oder Stunden h ausgedrückt).

Die mittlere Wachstumskonstante k , oder die Anzahl der Zellteilungen/Zeiteinheit, kann wie folgt definiert werden:

$$k = \frac{1}{g}$$

Quellen

Rose AH, Harrison JS (1971)
The Yeasts
Academic Press, New York

Rose MD, Winston F, Hieter P (1990)
Methods in Yeast Genetics: A Laboratory Manual
Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York

Prescott LM, Harley JP, Klein DA (1999)
Microbiology (fourth edition)
WBC/McGraw-Hill, New York

Campbell I, Duffus JH (1996)
Yeast – A Practical Approach
Oxford University Press, IRL Press, Washington DC