

Beitrag zur Fraktionierung der Blattzellen in nichtwässrigem Milieu

3

Die Möglichkeit, tierische und pflanzliche Zellen und Gewebe in ihre cytologischen bzw. histologischen Komponenten zu zerlegen, wurde zuerst von BEHRENS¹⁻³ systematisch untersucht. Das Prinzip des von ihm eingeführten Verfahrens ist folgendes: Das zu zerlegende Material wird zur Fixierung seines Zustandes lyophilisiert und anschliessend zerkleinert. Aus dem Gewebe- bzw. Zellpulver werden die Komponenten auf Grund ihrer verschiedenen Dichte, Grösse oder auch Form in indifferenten organischen Medien oder deren Mischungen getrennt. In der Literatur wird dieses Verfahren als BEHRENS-Methode bezeichnet¹.

Grosse Bedeutung hat heute die Fraktionierung von Gewebshomogenaten in wässrigem Milieu ohne vorherige Fixation des Untersuchungsmaterials. Beide Methoden haben Vor- und Nachteile. Während beim Arbeiten mit wässrigen Medien Proteine, Fermente und andere wasserlösliche Substanzen durch Auswaschung den Zellkomponenten verlorengehen, können bei der BEHRENS-Methode einige empfindliche Fermente eine Aktivitätseinbusse erleiden, und den Zellbestandteilen wird ein Teil der Lipide durch die organischen Lösungsmittel entzogen. Es ist daher in vielen Fällen angebracht, die Fraktionierung des Ausgangsmaterials sowohl in wässrigem als auch in nichtwässrigem Milieu vorzunehmen, um durch Kombination der nach den beiden Methoden erhaltenen Ergebnisse zu einwandfreien Schlüssen über die Zusammensetzung und Funktion der einzelnen Zellkomponenten zu gelangen. So wird in jüngster Zeit die BEHRENS-Methode in zunehmendem Masse zur Isolierung von Zellkomponenten (Chloroplasten und Cytoplasma) aus Pflanzenzellen eingesetzt⁵⁻¹², da die früher ausschliesslich auf wässrigem Wege aus Blatthomogenaten gewonnenen Zellfraktionen sich zur Lösung vieler Probleme als ungeeignet erwiesen.

Der bei beiden Methoden auftretende Substanzverlust hat eine Änderung des prozentualen Anteils der am Aufbau der Zellkomponenten beteiligten Stoffe zur Folge. Das an den isolierten Zellkomponenten gewonnene analytische Bild ist deshalb mehr oder weniger verfälscht. Es ist daher anzustreben, solche Versuchsanordnungen auszuarbeiten, bei denen die Fraktionierung der Zellen und Gewebe mit einem möglichst geringen Substanzverlust für die zu isolierenden Zellkomponenten verbunden ist; diese Forderung kann weitgehendst bei Anwendung der BEHRENS-Methode erfüllt werden.

In einer früheren Mitteilung¹³ wurde dargelegt, dass Petroläther und Tetra-chlorkohlenstoff als apolare Flüssigkeiten nur wenig Blattlipide lösen und somit als Suspensionsmittel für die Isolierung von Zellkomponenten aus Blattzellen mit der nichtwässrigen Trennmethode geeignet sind.

Als Ergänzung hierzu wird im folgenden angegeben, in welchem Masse die Lipidextraktion durch diese beiden organischen Lösungsmittel von der Temperatur, der Dauer der Einwirkung und von der angewandten Menge abhängt. Letzteres war nur für Petroläther zu ermitteln, da lediglich hiervon grössere Mengen bei der präparativen Isolierung von Chloroplasten und Cytoplasma benötigt werden.

Als Versuchsobjekt dienten junge Sprosse von *Elodea canadensis*, die wir schon bei unseren früheren Versuchen hauptsächlich einsetzten. Vor der Gefriertrocknung wurden die Sprosse 48 Std im Dunkeln gehalten. Nach der Lyophilisation wurden die Sprosse fein pulverisiert und das Pulver bis zum Gebrauch vor Luftfeuchtigkeit

geschützt aufbewahrt. Die Bestimmung der Gesamtlipide wurde nach den früheren Angaben durchgeführt¹³.

Das Resultat der Versuche ist in den Fig. 1–3 dargestellt. Wie aus Fig. 1 hervorgeht, ändert sich die extrahierte Lipidmenge durch Petroläther und Tetrachlorkohlenstoff in einem Temperaturbereich von -10° bis $+10^{\circ}$ kaum. Über $+10^{\circ}$ ist die Extraktion durch beide Flüssigkeiten erheblich intensiver, so dass alle Operationen

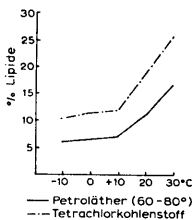


Fig. 1. *Elodea canadensis*. Lipidextraktion bei verschiedenen Temperaturen. Versuchsansatz: Bei den angegebenen Temperaturen wurden jeweils 50 ml Solvens mit 1 g Sprosspulver 1 Std geschüttelt. Nach Filtration wurde von dem Filtrat ein bestimmtes Volumen unter vermindertem Druck bis zur Trockne verdampft, der Rückstand im Vakuumexsikkator über konz. Schwefelsäure getrocknet und als Lipide gewogen.

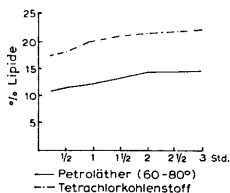


Fig. 2. *Elodea canadensis*. Lipidextraktion in Abhängigkeit von der zeitlichen Einwirkung der Lösungsmittel. Versuchsansatz: Jeweils 50 ml Solvens mit 1 g Sprosspulver wurden bei etwa 20° entsprechend den auf der Abszisse angegebenen Zeiten geschüttelt. Nach Filtration wurde von dem Filtrat ein bestimmtes Volumen unter vermindertem Druck bis zur Trockne verdampft, der Rückstand im Vakuumexsikkator über konz. Schwefelsäure getrocknet und als Lipide gewogen.

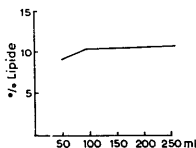


Fig. 3. *Elodea canadensis*. Lipidextraktion in Abhängigkeit von der Petroläthermenge. Versuchsansatz: Jeweils 2 g Sprosspulver wurden mit den angegebenen Mengen Petroläther (60–80°) 1 Std bei etwa 20° geschüttelt. Nach Filtration wurde von dem Filtrat ein bestimmtes Volumen unter vermindertem Druck bis zur Trockne verdampft, der Rückstand im Vakuumexsikkator über konz. Schwefelsäure getrocknet und als Lipide gewogen.

zur Isolierung der Chloroplasten möglichst unter der genannten Temperatur auszuführen sind, wenn die Extraktion von Lipiden auf ein Minimum beschränkt bleiben soll. Eine längere Einwirkung der Lösungsmittel (bis zu 3 Std) erhöht den Lipidverlust nur wenig (Fig. 2). Die durch Petroläther extrahierte Lipidmenge ist fast unabhängig von der angewandten Menge des Lösungsmittels (Fig. 3), d.h., dass selbst die Verwendung einer grösseren Menge Petroläther bei der Fraktionierung von *Elodea*-Sprossen keinen erheblichen Verlust an Lipiden verursacht.

Das Ergebnis der Versuche zeigt, dass bei Anwendung der BEHRENS-Methode zur Isolierung von Chloroplasten und Cytoplasma aus Blattzellen nur ein geringer Lipidverlust eintritt, wenn Petroläther und Tetrachlorkohlenstoff bzw. deren Mi-

sungen als Suspensionsmedium gewählt werden und die Temperatur während der Isolierungsoperationen unter 10° bleibt. Der eingetretene Lipidverlust verfälscht die Analyse der isolierten Chloroplasten dann nur wenig; demgegenüber erleiden Chloroplasten bei Isolierung in wässrigen Medien einen starken Stoffverlust. Insbesondere werden leicht Proteine ausgewaschen. So fand HEBER¹⁴ durch seine Untersuchungen über den Chloroplastenproteinanteil am Gesamtproteingehalt der Blattzelle (Weizen- und Saubohnenblätter als Versuchsmaterial) nach Isolierung der Chloroplasten in wässrigem und in nichtwässrigem Milieu, dass bis zu 50 % des Chloroplastenproteins während der Isolierungsoperation in wässrigen Medien verlorengehen. Weiterhin wurden durch elektronenmikroskopische Untersuchungen Unterschiede im Proteingehalt der nach den beiden Methoden isolierten Chloroplasten festgestellt; nach dem Ergebnis der Untersuchungen ist der Proteingehalt der nach der BEHRENS-Methode gewonnenen Chloroplasten höher¹⁵.

Bei den von uns vorgenommenen vergleichenden Untersuchungen konnte ebenfalls ein erheblicher Unterschied im Proteingehalt der Chloroplasten festgestellt werden. Im wässrigen Milieu (0.5 M Rohrzuckerlösung) durch fraktionierende Zentrifugierung des Sprosshomogenats (MENKE¹⁶, GRANICK¹⁷ and MCCLENDON¹⁸) isolierte und anschliessend gefriergetrocknete Elodea-Chloroplasten enthielten 7.0 % Proteinstickstoff,

TABELLE I

Elodea canadensis. PROTEINVERLUST VON IN NICHTWÄSSRIGEM MILIEU GEWONNENEN CHLOROPLASTEN NACH SUSPENSION IN WÄSSRIGEN ISOLATIONSFLÜSSIGKEITEN

Versuchsansatz: In je 10 ml der aufgeführten Flüssigkeiten wurden 50 mg Chloroplasten suspendiert und die Suspensionen unter gelegentlichem Schütteln 1 Std bei 4° aufbewahrt. Nach dem Zentrifugieren wurde in den chloroplastenfreien Überständen das Protein durch Zugabe von 20 prozentiger Trichloressigsäurelösung (10 ml pro Ansatz) gefällt und die Niederschläge kjeldahlisiert (Methode nach BEET¹⁹). Zur Ermittlung des Proteins wurden die gefundenen Stickstoffwerte mit 6.25 multipliziert.

Suspensionsmedium	Proteinverlust (%)
0.5 M Rohrzuckerlösung	28.9
0.35 M Natriumchloridlösung	27.6
Dest. Wasser	28.9
0.4 M Rohrzuckerlösung- 0.15 M Phosphatpuffer (pH 7.0)	31.2

was einen Proteingehalt von 43.75 % ergibt (Faktor 6.25); dagegen ermittelten wir bei in nichtwässrigem Milieu (Petroläther, Tetrachlorkohlenstoff) gewonnenen Elodea-Chloroplasten (Dichtegradienten-Verfahren) einen Proteinstickstoffgehalt von 8.7 %, woraus sich ein Proteingehalt von 54.4 % errechnet (alle Angaben sind Mittelwerte).

Für einen Proteinverlust der Chloroplasten bei Isolierungsoperationen in wässrigem Milieu spricht auch folgender Versuch: Werden in organischem Milieu gewonnene Chloroplasten nachträglich dem Milieu der wässrigen Trennverfahren ausgesetzt, so verlieren sie einen beträchtlichen Teil ihres Proteins (s. Tabelle I).

Staatliches Chemisches Untersuchungsamt,
Giessen (Westdeutschland)

R. THALACKER

- ¹ M. BEHRENS, *D.R.P.* Nr. 568547 (7.6.1929).
- ² M. BEHRENS, *Z. Physiol. Chem.*, 209 (1932) 59.
- ³ M. BEHRENS, in E. ABDERHALDEN, *Zell- und Gewebetrennung, Handbuch der biologischen Arbeitsmethoden*, Abt. 5, Teil 10, Urban und Schwarzenberg, Berlin und Wien, 1938, S. 1363.
- ⁴ N. G. ANDERSON, in G. OSTER UND A. W. POLLISTER, *Mass Isolation of Components, Physical Techniques in Biological Research*, Vol. 3, Academic Press, New York, 1956, p. 300.
- ⁵ M. BEHRENS UND R. THALACKER, *Naturwissenschaften*, 44 (1957) 621.
- ⁶ U. HEBER, *Ber. Deut. Botan. Ges.*, 70 (1957) 371.
- ⁷ R. THALACKER UND M. BEHRENS, *Z. Naturforsch.*, 14b (1959) 443.
- ⁸ R. THALACKER UND M. BEHRENS, *Naturwissenschaften*, 47 (1960) 259.
- ⁹ C. R. STOCKING, *Plant Physiol.*, 34 (1959) 56.
- ¹⁰ R. M. SMILLIE AND R. C. FULLER, *Plant Physiol.*, 34 (1959) 651.
- ¹¹ U. HEBER, *Z. Naturforsch.*, 15b (1960) 100.
- ¹² U. HEBER, *Nature*, 195 (1962) 91.
- ¹³ R. THALACKER UND M. BEHRENS, *Experientia, Basel*, 16 (1960) 165.
- ¹⁴ U. HEBER, *Z. Naturforsch.*, 15b (1960) 95.
- ¹⁵ U. HEBER UND E. TYSZKIEWICZ, *J. Exptl. Botany*, 13 (1962) 185.
- ¹⁶ W. MENKE, *Z. Physiol. Chem.*, 257 (1938) 43.
- ¹⁷ S. GRANICK, *Am. J. Botany*, 25 (1938) 558.
- ¹⁸ J. H. McCLENDON, *Am. J. Botany*, 39 (1952) 275.
- ¹⁹ E. A. BEET, *Nature*, 175 (1955) 514.

Eingegangen am 19. November, 1962

Biochim. Biophys. Acta, 70 (1963) 477-480