

## 分裂酵母の培養

Chie Mori (+ H. Masuda) 020624

S. pombeの通常のvegetative growthのためには、YES培地を用いる。接合や胞子形成が起きにくい。S. cerevisiaeで使われるYPD培地では、S. pombeは接合、胞子形成ができる。京大柳田研ではYPDを用いてmutantsを単離したため、YPD培地のみでphenotypeが現れる株 (nda3など)があるので、注意。

wild typeは、通常29°C-32°Cで培養する。36.5°C以上、18°C以下では正常な生育ができない。高温感受性株は、25-26°Cで培養する。制限温度は、35.5-36.5°C。低温感受性株は、29°C-32°Cで培養する。制限温度は、20°C。

S. pombeは、nitrogenあるいはglucoseの枯渇によって、G1あるいはG2 phaseで、stationary phaseに入る。通常のYES培地では、glucoseがlimiting factorになるので、G2 phaseでstationary phase に入る。

### 液体培養

physiological experimentを行う場合はmid-exponential phaseの細胞を用いる。一定の生育条件を保つため、緩やかなshakingが必要。生育条件を正確に決めるために、合成培地EMM2を用いることが多い。

mid-exponential phaseの細胞濃度:  $2 \times 10^6$ - $1 \times 10^7$  cells/ml

stationary phaseの細胞濃度:  $2-5 \times 10^7$  cells/ml

細胞濃度を求めるためには、血球計算版(counting chamber)を用いる。培養液の吸光度で求めることもできるが(OD595=0.1 はおよそ  $2 \times 10^6$  cells/ml)、細胞株や培養条件の違いによって変わるので、注意が必要。血球計算版を使って、濃度と細胞の状態の両方をチェックしたほうがよい。

physiological experiment用のmid-exponential phaseの細胞を得るには、通常、前培養、本培養の2段階培養を行う。新たにプレート培養された株のsingle colonyを、10 ml YES (あるいは、selection marker付きのplasmidを持つ場合、EMM2)に懸濁する。1-2日間、early stationary phaseに入るまで、培養。この前培養液を、実験用の本培養に植え継ぐ(培養液の量に応じて、用いるフラスコのサイズを変える。液量の2-4倍のフラスコを用いる)。stationary phaseからの回復には1 generation time (倍加時間)が必要なので、それを考慮に入れて、必要量を計算する。generation timeは株や細胞の状態によっても変化するので、決まった時間に実験を始める場合は、濃度を変えたいいくつかの培養を準備して、最適なものを用いることもできる。

### Haploid strainのおおよそのgeneration time

(adapted from Molecular Genetic analysis of the fission yeast S. pombe. Methods in Enzymology, vol. 194. pp795-823)

medium	temperature (°C)	generation time
YE	20	~6 hr
	25	3 hr
	29	2.5 hr
	32	2.2 hr
	35.5	2 hr
EMM	20	~8 hr
	25	4 hr
	29	3 hr
	32	2.5 hr
	35.5	2.3 hr

### Phenotypeのテスト

#### ploidy (一倍体・二倍体)

分裂直前のhaploidは、長さ12-15  $\mu\text{m}$ 、太さ 3-4  $\mu\text{m}$ 。diploidは、長さ20-25  $\mu\text{m}$ 、太さ 4-5  $\mu\text{m}$ 。diploid cellはhaploidに比べて死にやすいので、死細胞を染めるフロキシシンBを含む培地 (YES+phloxinB)を用いると区別しやすい。diploidのコロニーはhaploidに比べて、より暗いピンクになる。

#### temperature sensitivity

36 C, 30C (26 C), 20 Cでの生育をチェック。

#### UV sensitivity (plate dilution assay by T.yamamoto)

野生株は100m<sup>2</sup>/joules程度ではほとんど生存率が落ちない。しかし、感受性を示す変異株は50-100m<sup>2</sup>/joulesでもかなり生存率が落ちる。簡単に見る場合はストリークしたプレートで良いかも知れないが、通常は希釈液をスポットしたプレートにUVを照射する。

#### [希釈液の作り方]

液体培養して対数増殖させる。細胞数を計測し2.0x10<sup>7</sup> cells/mlに合わせ、これを1/5希釈する(4.0x10<sup>6</sup> cells/mlになる)。希釈に滅菌水を培養液のかわりに用いてもよい。さらにこの希釈液を1/5希釈すると、8.0x10<sup>5</sup> cells/mlとなる。このようにして1/5希釈をくり返し、1.6x10<sup>5</sup> cells/ml、3.2x10<sup>4</sup> cells/ml、6.4x10<sup>3</sup> cells/mlの希釈液を作る。こうしてできた段階的な希釈液をプレートに1-2 μlずつ並べてのせる(スポットする)。プレートが古くて乾いている場合はスポットしにくくなるが、事前に滅菌水で湿らせておくと良い。サンプルが多い場合は、48穴プレートとスポッター (浅川さんが持っている)を使うと良い。1/10希釈でする場合もある。

希釈前	2.0x10 <sup>7</sup> cells/ml
1回目	4.0x10 <sup>6</sup> cells/ml
2回目	8.0x10 <sup>5</sup> cells/ml
3回目	1.6x10 <sup>5</sup> cells/ml
4回目	3.2x10 <sup>4</sup> cells/ml
5回目	6.4x10 <sup>3</sup> cells/ml

#### [UV照射のやり方]

コスモバイオL254 (UVクロスリンカー)を使う。表示されている単位はcm<sup>2</sup>/joulesになっているので、例えば50m<sup>2</sup>/joulesにセットしたい時は0.005にする。スタートボタンを押せば照射が始まる。プレートはフタをとる。

#### TBZ sensitivity

TBZを最終濃度がそれぞれ5、10、15、20、25、30 μg/mlとなるように添加したYES培地に、菌をストリークする。野生株でも50 μg/ml程度で完全に生育が阻害される。より強く選択圧をかけたい場合はEMM2培地を用いたり、培養温度を上げて(下げて)も良い。

#### 保存

次のどちらかの方法で20-30% glycerolを含むYES培地に細胞を懸濁し、-70℃で保存する。少なくとも、数年間は保存できる。

stock: 50-60% (v/v) glycerol. autoclave.

- 1) cryovialにYES培地と50% glycerolを等量加える。YEA plate上で2-3日生育させた細胞をかき取って、cryovial内の溶液に懸濁 (+Vortex)。-70℃で保存。
- 2) シングルコロニーからYEAあるいはEMM2中でstationary phaseまで液体培養を行う。cryovialに培養液と50% glycerolを等量加える。vortex。-70℃で保存。

短期保存のためには、YES plate上に細胞を生やした状態で、4℃で二ヶ月間まで保存できる。plateはテープで密封する。EMM2やphloxin Bを含む培地上では長く保存できない。

凍結ストックから株を起こす場合は、爪楊枝やイエローチップで細胞をかき取り、YES plate上に移す。爪楊枝やイエローチップを突き刺すようにして細胞をかき取る。表面だけをかき取ると、氷がほとんどの場合がある。数日してコロニーが見えてきたら、シングルコロニーを得るために、plate上に塗り広げる。