

Izolace DNA z kvasinek



Jana Kopecká

223187@mail.muni.cz

Oddělení mikrobiologie a molekulární biotechnologie
ÚEB PŘF MU

Obsah

1. Proč?
2. Kvasinky
3. Izolace – postupy
4. Kontrola a další použití

Doporučená literatura

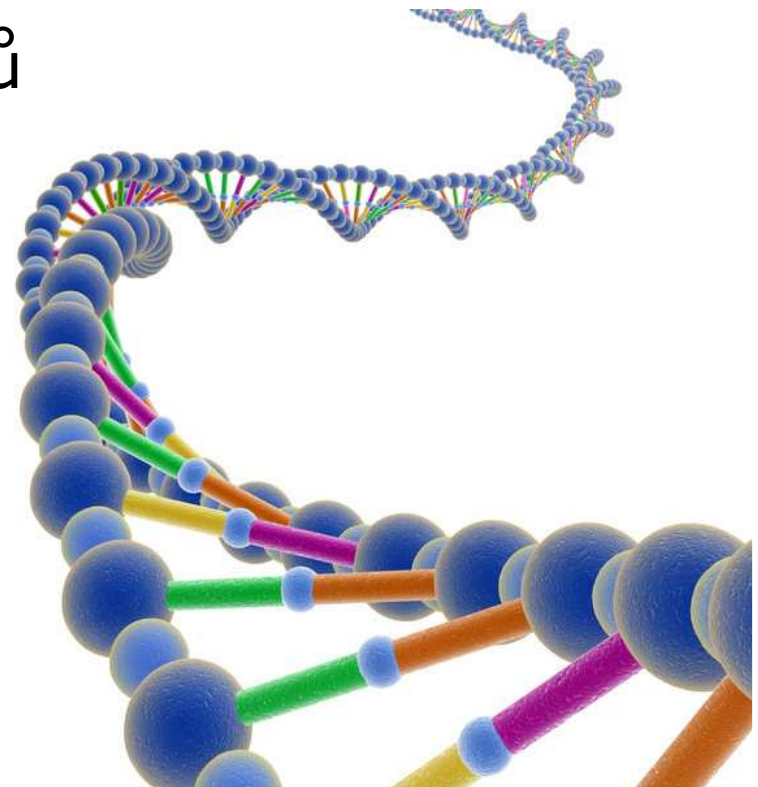
- Přednáška !!
- Podrobněji např.:
- Sambrook a Russell (2001): Molecular cloning, a laboratory manual.
- Giudici a Pulvirenti (2002): Molecular methods for identification of wine yeasts.
- a mnoho dalších článků a knih...

Proč izolovat DNA/RNA z kvasinek?

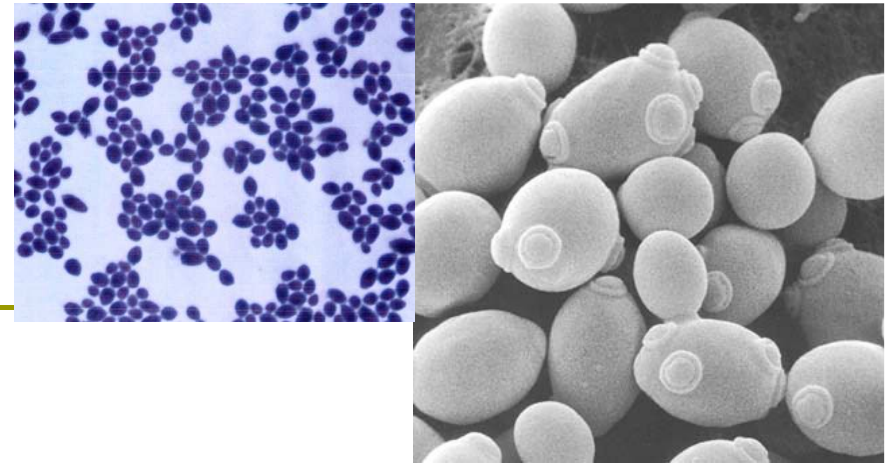
- ❑ běžné mikrobiologické a biochemické testy jsou často nepřesné a nedostatečné
- ❑ testy mohou být ovlivněny kultivačními podmínkami
- ❑ jednotlivé rody či druhy mají shodné či variabilní výsledky
- ❑ → analýza sekvencí evolučně konzervativních genů či oblastí na DNA
- ❑ nejčastěji oblast ITS (Internal Transcribed Spacer), která se nachází mezi podjednotkami genů pro rDNA, 18S, 5,8S a 26S

Proč izolovat DNA/RNA z kvasinek?

- Ověření přítomnosti mikroorganismů
- Porovnání + klasifikace
- PCR – klonování, exprese genů
- mtDNA
- chromosomální DNA
- RNA
- plazmidová DNA
- ...



Kvasinky



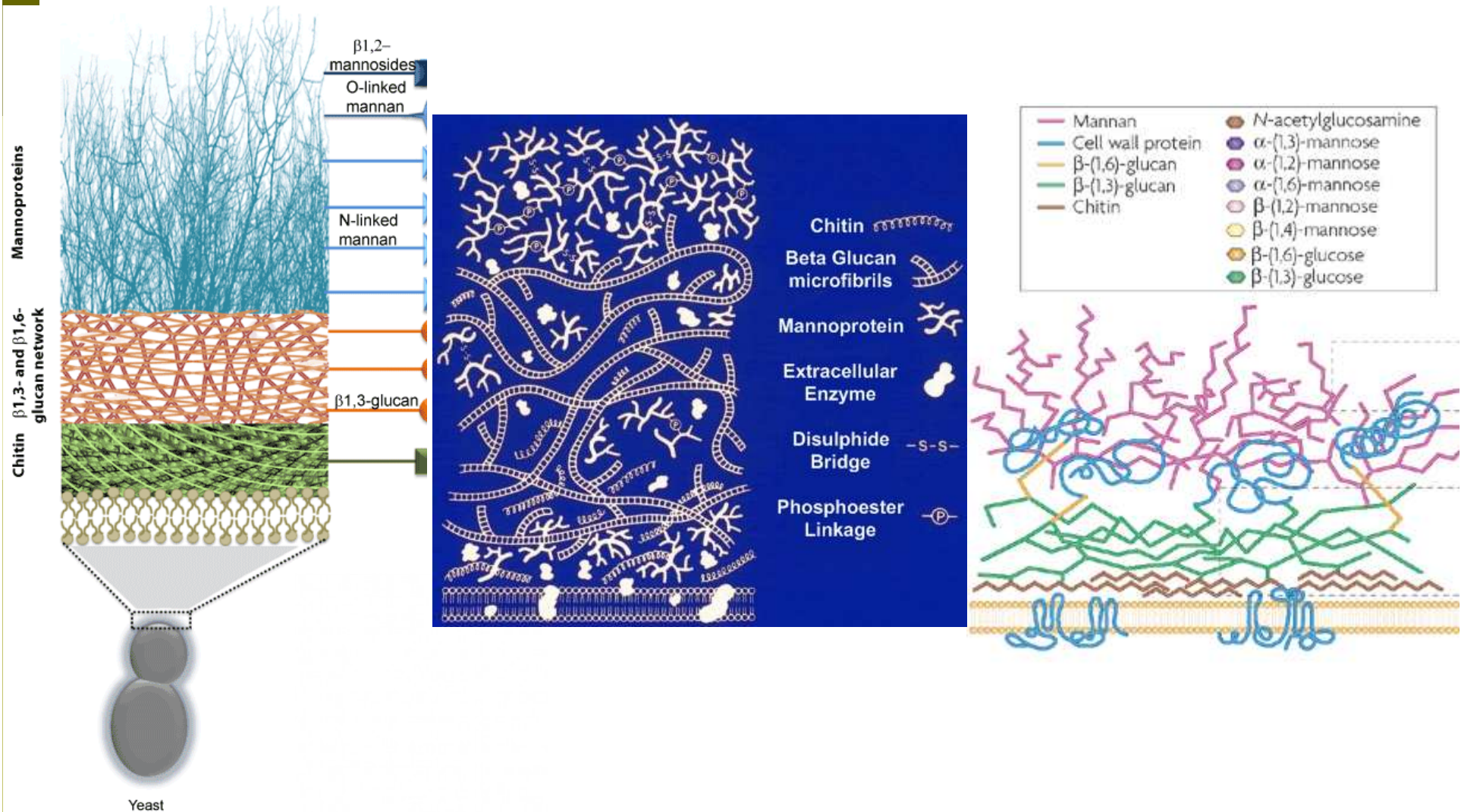
- Eukaryota, heterotrofní
- Široké využití (potravinářství, farmacie, medicína, modelové organizmy, atd.)
- Ale i patogenní kvasinky
- *Genom: S. cerevisiae* 12 Mb, 16 chromozomů (1996)
S. pastorianus 25 Mb, 36 chromozomů (2009)



Buněčná stěna kvasinek

- **Odlišné složení od prokaryot!!!!**
- Tvorba jizev - pučení (chitin)
- Shlukování (i s bakteriemi), rozpoznávání buněk opačného párovacího typu, přilnavost k povrchům, ...
- **polysacharidy (β -1,3-glukan, β -1,6-glukan)
glykozylované bílkoviny (manoproteiny)
chitin**

Buněčná stěna kvasinek



Izolace DNA - obecně

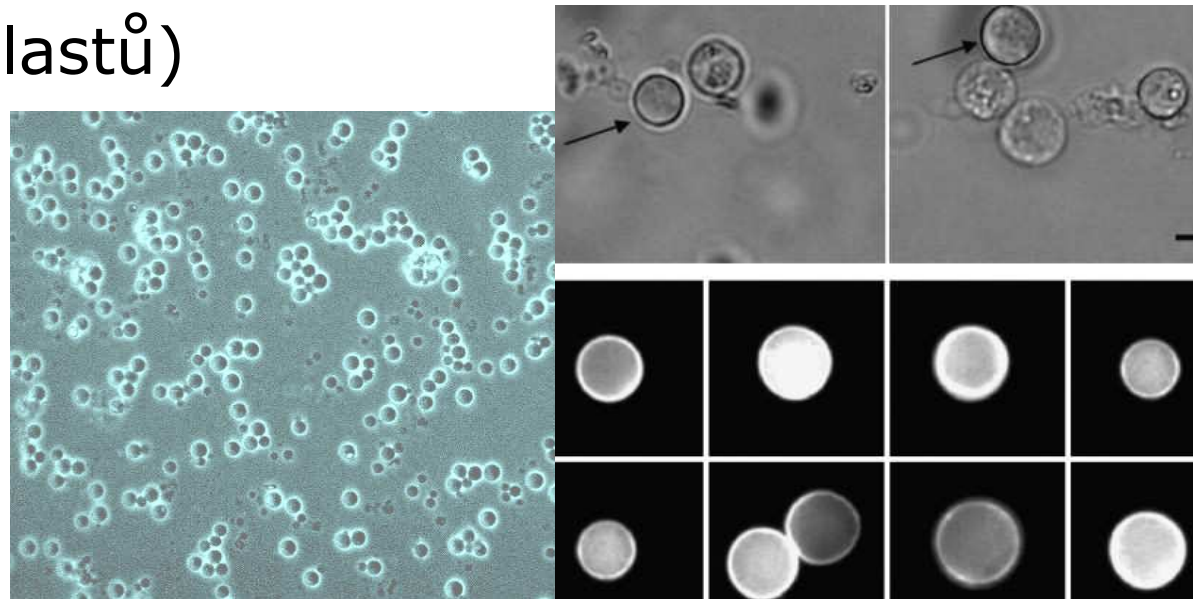
- Zisk kultury + nárůst buněk
- Odstranění buněčné stěny
- Lyze buněk
- Izolace a přečištění DNA
- Ověření gelovou elektroforézou

Izolace DNA – fenol I.

1. Promytí buněk vodou a EDTA (vyvázání iontů, které jsou potřebné pro funkčnost nukleáz)
2. Mechanické rozbití buněk, sonikace
nebo
enzymatická lyze buněčné stěny
 - hydrolýza poly- $\beta(1\rightarrow3)$ -glukózy
 - ❑ Lytikáza (endoglukanáza, proteáza)
 - ❑ Zymoláza
(β -1,3-glukan laminaripentaohydroláza, β -1,3-glukanáza, proteáza, mananáza)
 - ❑ β -d-glukuronidáza (glusulase)

Izolace DNA – fenol II.

3. Tvorba sferoplastů (protoplastů)

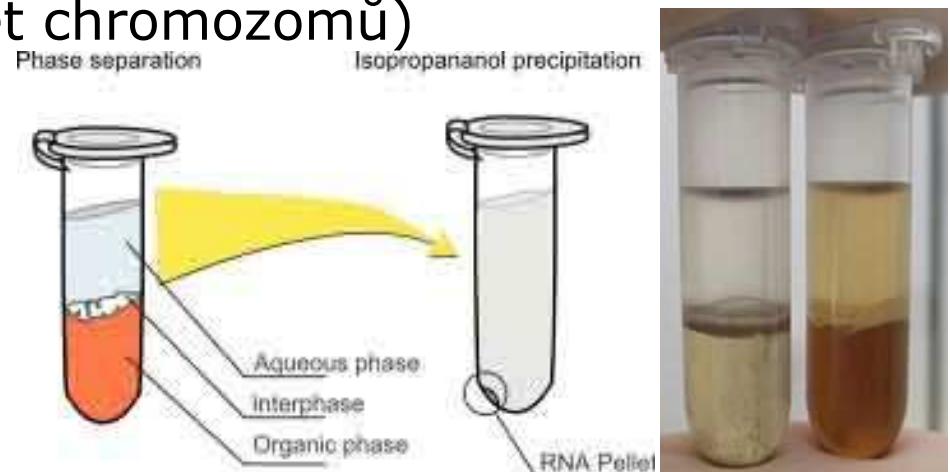


4. Lyze – EDTA, proteináza K, 10 % SDS (rozpouští tuky .. narušení membrány)

Izolace DNA – fenol III.

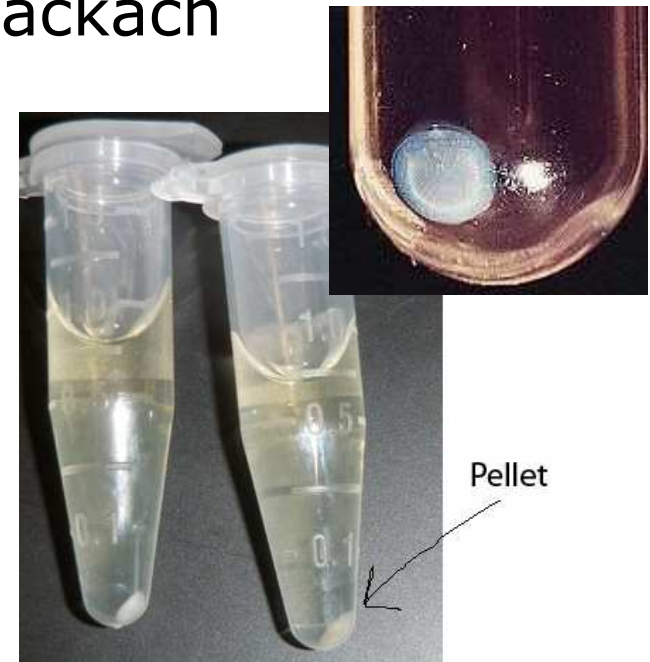
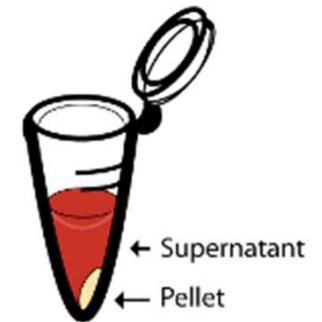
5. Přidání fenolu a následně směsi izoamylalkohol:chloroform v poměru 1:24 (ve které se rozpouští fenol a tedy vymizí z vodné fáze)
6. Rozdělení směsi na spodní organickou a horní vodnou (s DNA) fází, mezi nimi jsou vysrážené proteiny
!!!odpipetování špičkou s ustříhlým koncem (střížné síly, velikost a počet chromozomů)

6. Přídavek RNázy



Přečištění DNA

- K hrubému lyzátu se přidá 0,7 objemu izopropanolu/etanolu
- Vysrážení při -20°C
- Centrifugace DNA při vysokých otáčkách
- Vysušení, rozpuštění
→ zakoncentrování
(TE pufr, voda, 10 mM Tris)
- Uchování při 4°C
(zmražení může poškodit chromozomy)

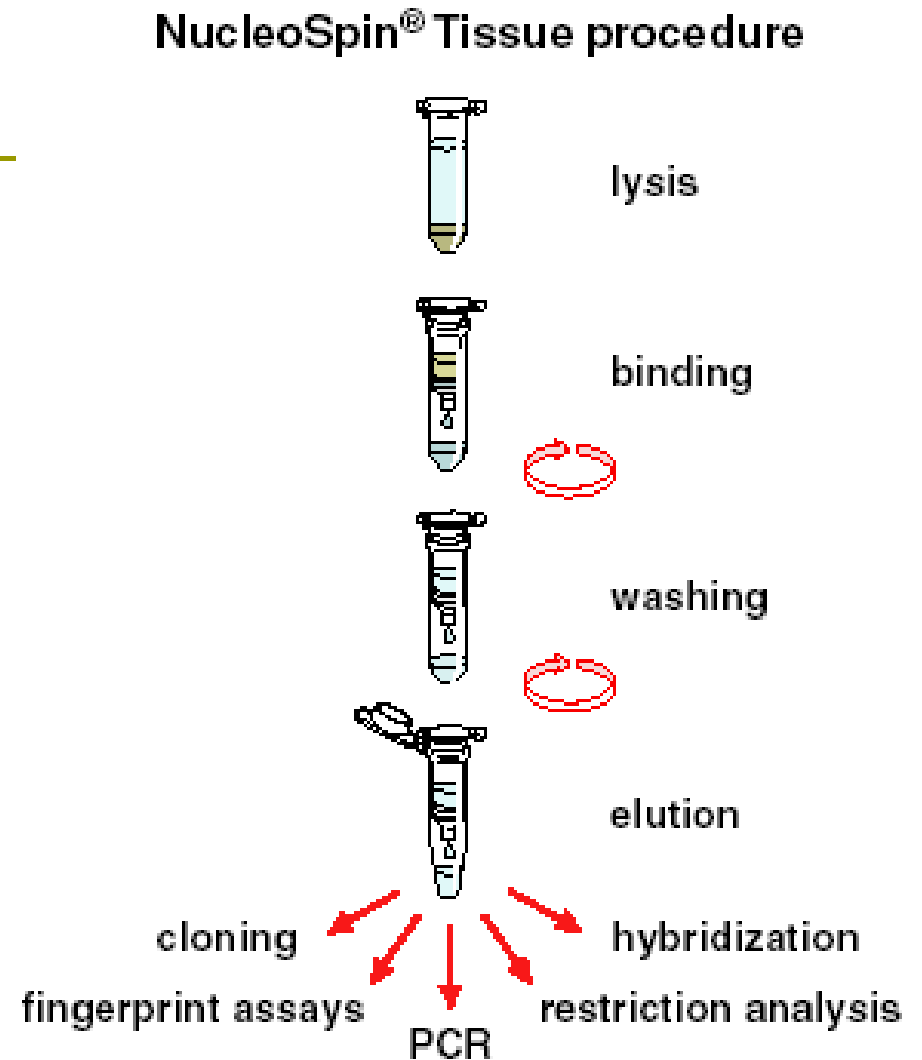


Izolace DNA - kity

- Bez fenolu, většinou silika kolonky
- Mechanické X enzymatické rozbití buněk
- Většinou neobsahují enzym pro rozbití buněčné stěny – nutno dokoupit!
- Často je třeba namíchat pufr pro rozbití buněk (není součástí kitu)
- Nižší výtěžky, stabilita, kompaktnost chromozomů
- Pro jednorázové stanovení dostačující, pro dlouhodobou manipulaci s DNA zvolit šetrný způsob izolace

Izolace DNA - kity

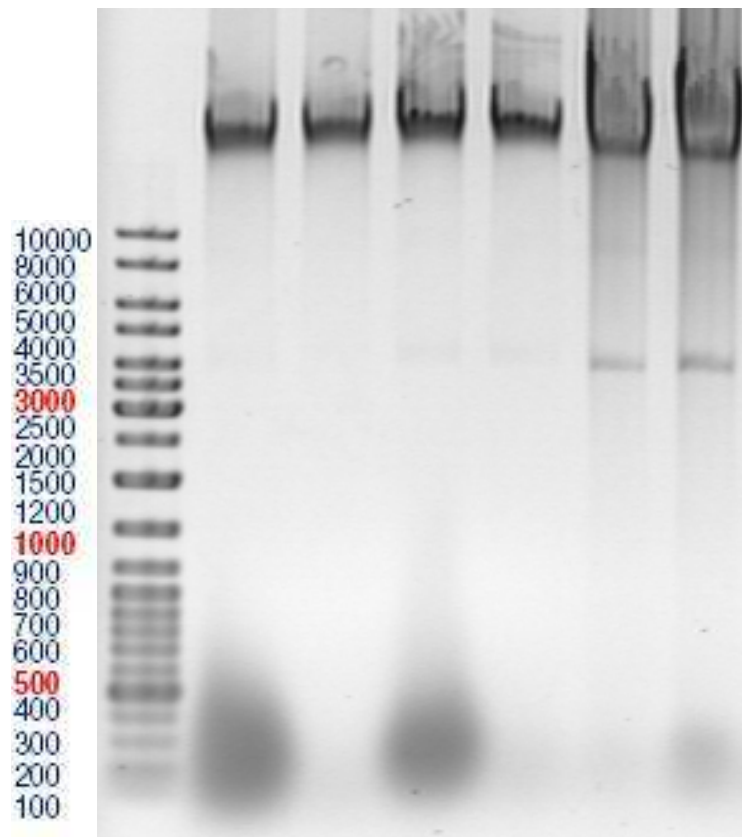
- Jednoduché
- Rychlé
(ALE rozbití buněčné stěny)
- Neznámé složení roztoků
- Dražší v porovnání
s fenolovou metodou
- Nutno dokoupit enzym
a namíchat roztoky



Macherey-Nagel (Německo)

Kontrola

□ Gelovou elektroforézou



← plazmid.DNA

M – velikostní standard

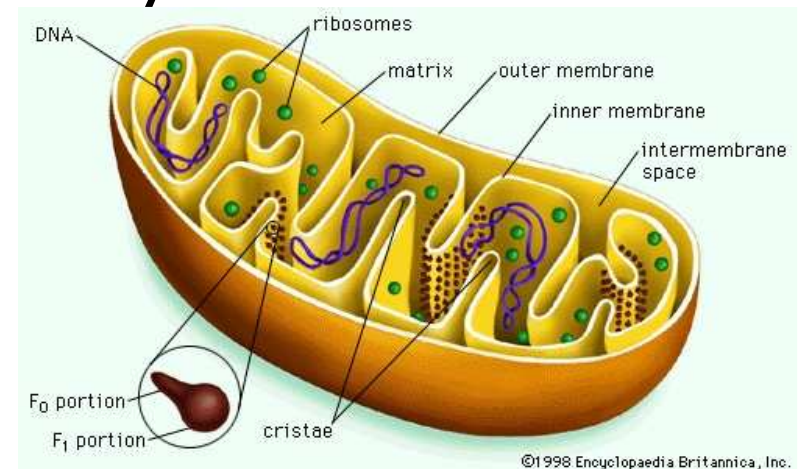
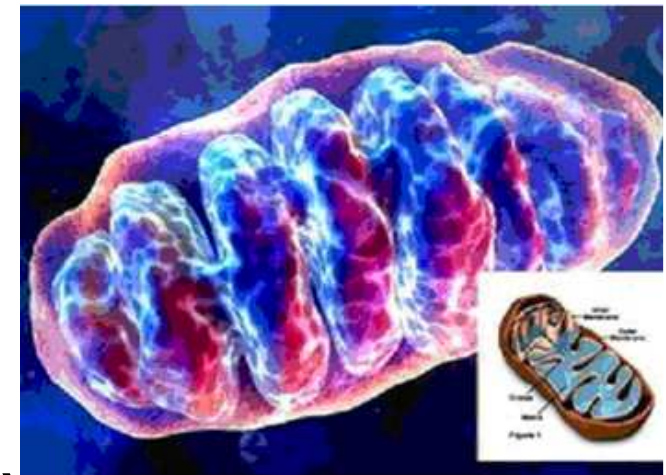
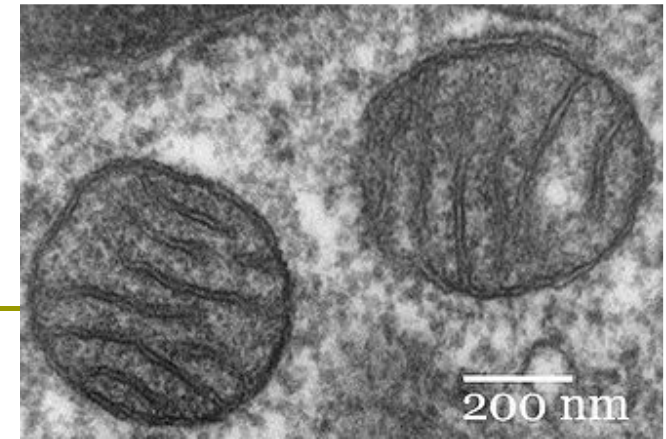
1,3 – hrubý lyzát před přidáním RNázy

2,4 – hrubý lyzát po přidání RNázy

5,6 – přečištěná DNA

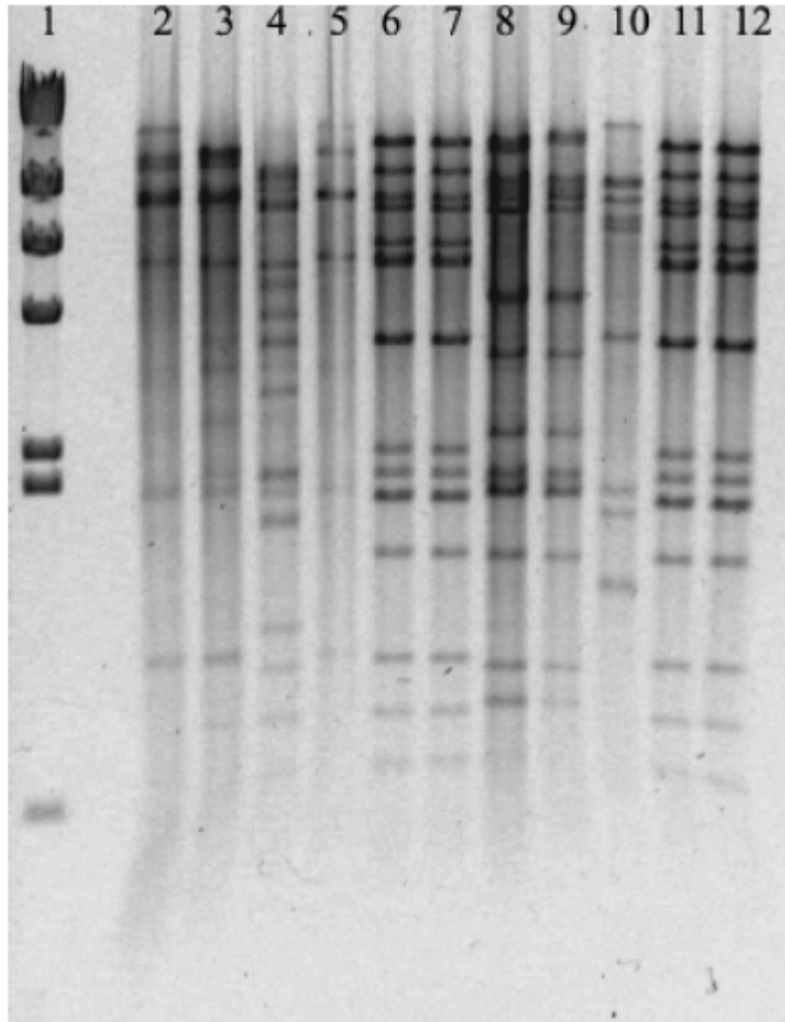
Mitochondrie kvasinek

- „Buněčná elektrárna“ → ATP
- Vnější a vnitřní membrána
- Počet: 15 - 29 v závislosti na fyziologickém stavu buňky
- Velikost: 0,6 - 2,1 μm

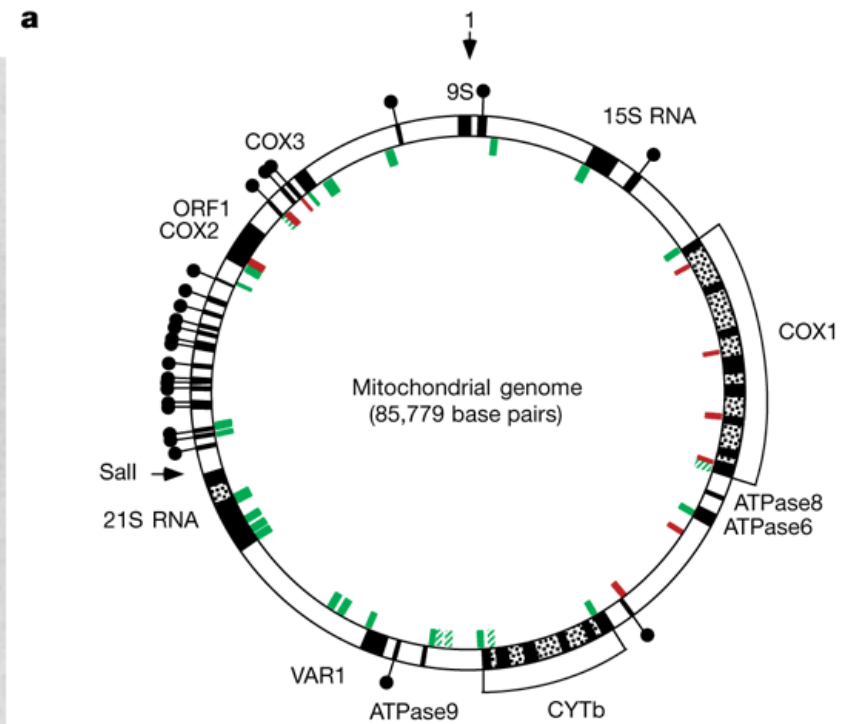


mtDNA

- 85 779 bp u *S. cerevisiae*
- 70 578 bp u *S. pastorianus*
- 64 300 bp u *S. bayanus*
- Různá velikost, pořadí genů,...



□ RFLP mtDNA
(Rainieri et al. 2008)



b

Survivor	Insertion length (nucleotides)	Position of fragment on the mitochondrial DNA sequence	Characteristics of the original mitochondrial sequence	Orientation
34-II-89 (b)	65	14,804–14,868	COX1(intronic ORF ai1)	parallel
622pBS8 (a)	101	19,870–19,770	COX1(intronic ORF ai3 encoding I-ScellII)	antiparallel
34-II-89 (a)	92	23,396–23,487	Intergenic region	parallel
34pAT9	97	25,795–25,699	COX1(intron ai5 γ)	antiparallel
622pBS8 (b)	52	30,114–30,063	Intergenic region (between ori7 and ORF5)	antiparallel
34pAS15 (b)	49	34,946–34,994	Intergenic region (between ori2 and tRNA ^{Glu}). G-C cluster	parallel
34pAS15 (a)	189	74,600–74,412	COX2 and ORF1	antiparallel
34pAS16	77	77,789–77,713	Intergenic region (between tRNA ^{phe} and tRNA ^{thr1})	antiparallel
34pAS7	47	79,020–79,066	Intergenic region (upstream of COX3)	parallel

Ricchetti et al. 1999

Izolace mtDNA

- Zisk kultury + růst buněk
- Odstranění buněčné stěny
- Rozbití/lyze buněk
- **Odstranění zbytků buněk a izolace mitochondrií (na základě centrifugace)**
- Lyze mitochondrií
- Izolace a přečištění DNA
- Ověření gelovou elektroforézou