

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

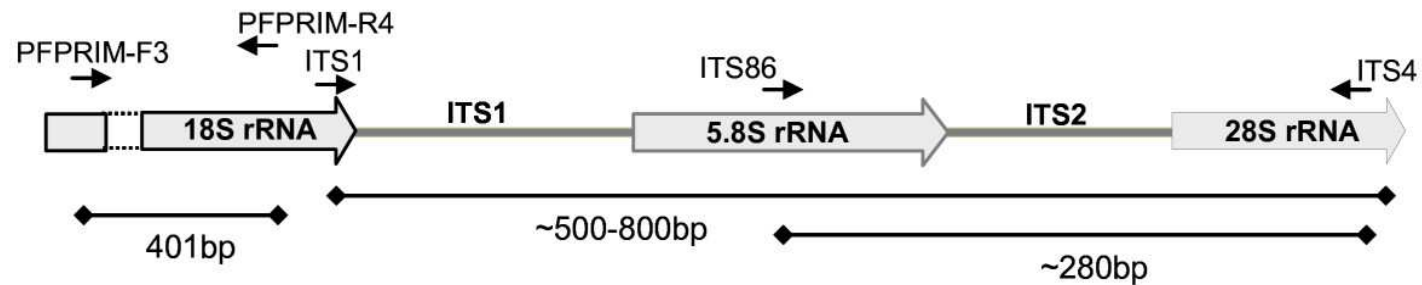
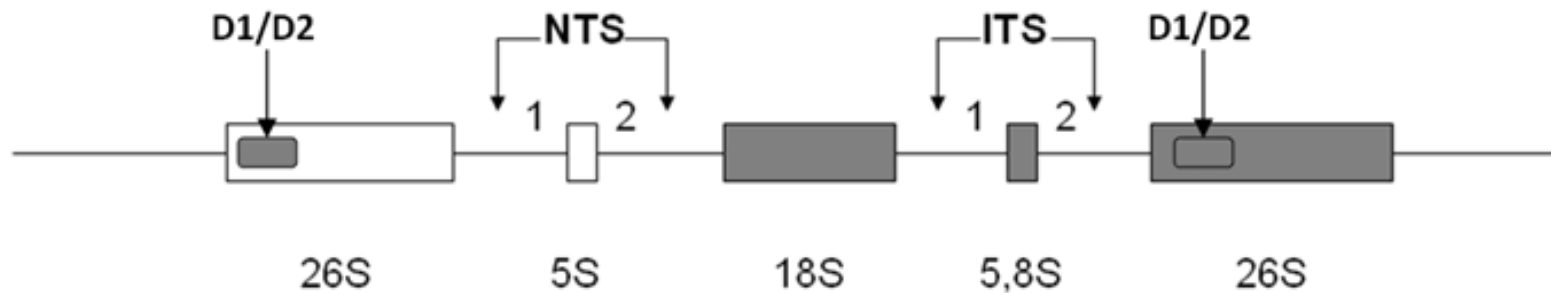
- Přednáška !!
- Podrobněji např.:
- Sambrook a Russell (2001): Molecular cloning, a laboratory manual.
- Giudici a Pulvirenti (2002): Molecular methods for identification of wine yeasts.
- a mnoho dalších článků a knih...

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 (chromozom XII)

ITS region

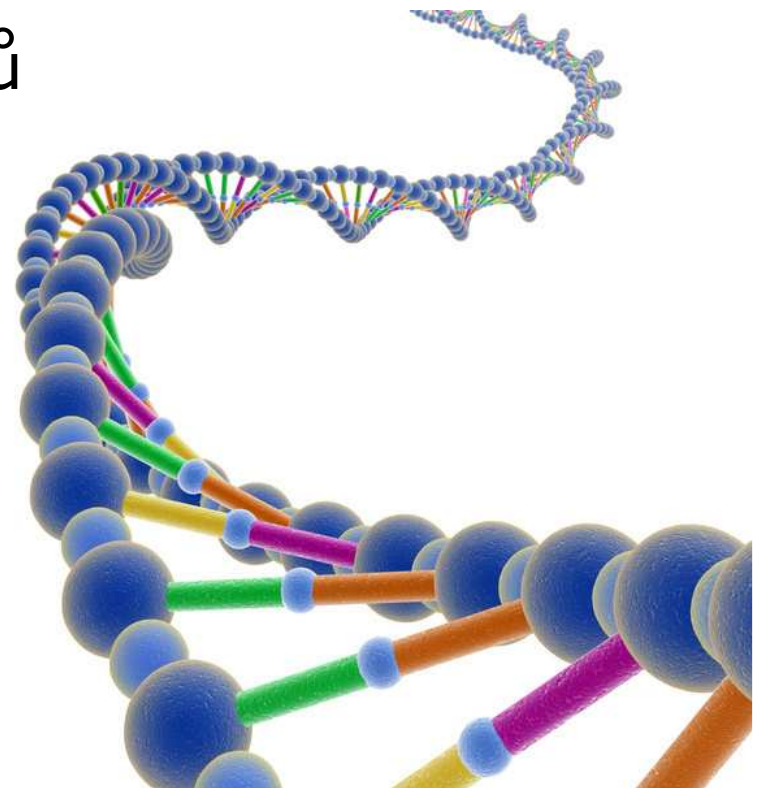
Schématické znázornění ITS, NTS a D1/D2 regionu (Giudici a Pulvirenti, 2002, upraveno)



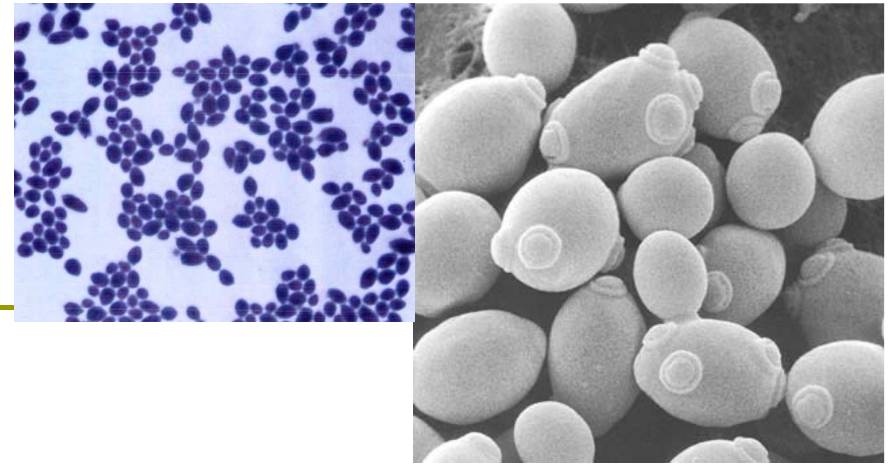
(zdroj: <http://www.biomedcentral.com/1471-2415/8/7/figure/F1?highres=y>)

Proč izolovat DNA/RNA z kvasinek?

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



Kvasinky



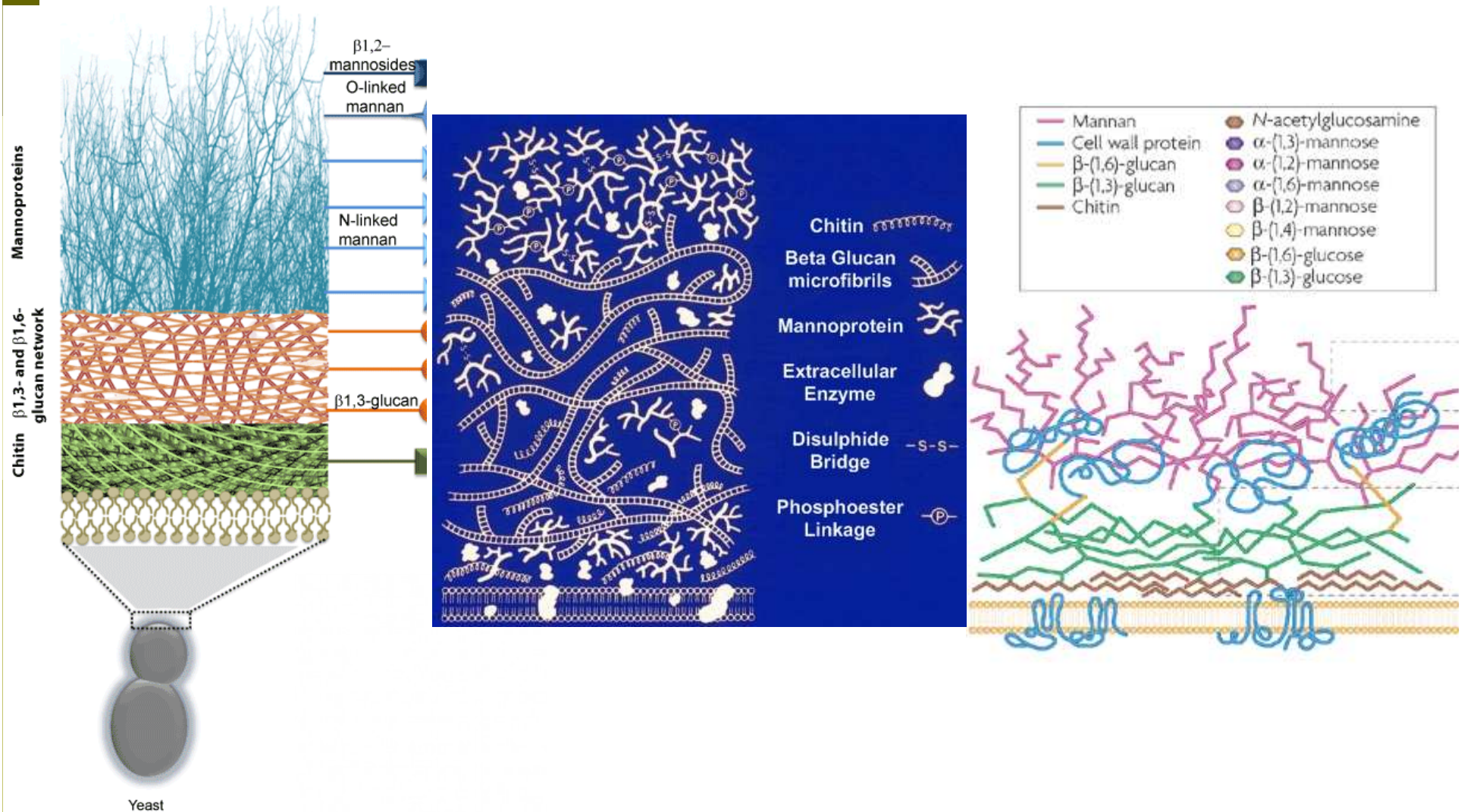
- Eukaryota, heterotrofní
- Široké využití (potravinářství, farmacie, medicína, modelové organizmy, atd.)
- Ale i patogenní kvasinky
- *Genom: S. cerevisiae* 12 Mb, 16 chromozomů (1996)
S. pastorianus 25 Mb, 36 chromozomů (2009)



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

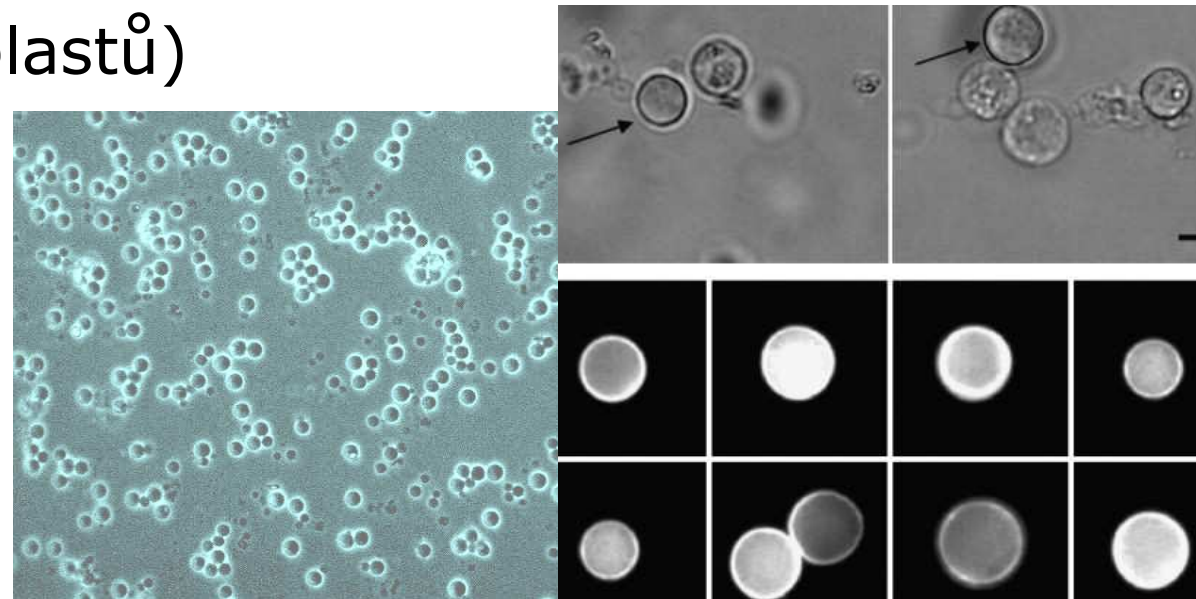
- Zisk kultury + nárůst buněk
- Odstranění buněčné stěny
- Lyze buněk
- Izolace a přečištění DNA
- Ověření gelovou elektroforézou

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)

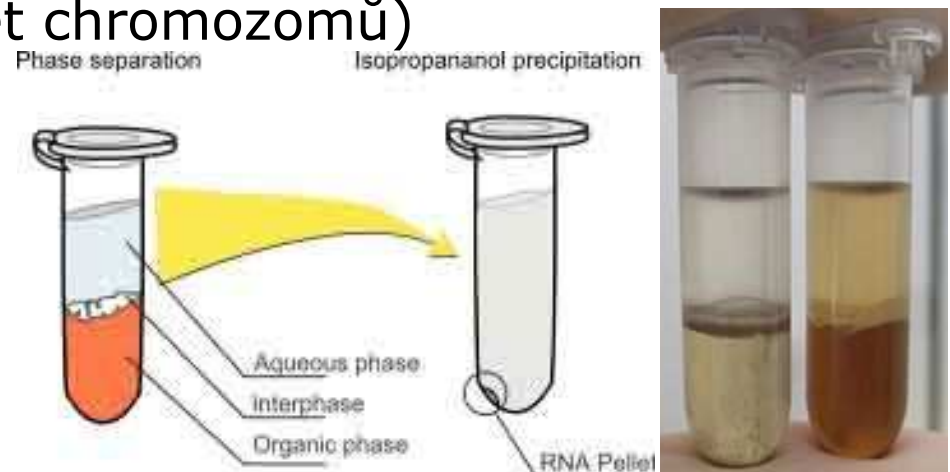


4. Lyze – EDTA, proteináza K, 10 % SDS (rozpouští tuky .. narušení membrány)

Izolace DNA – fenol III.

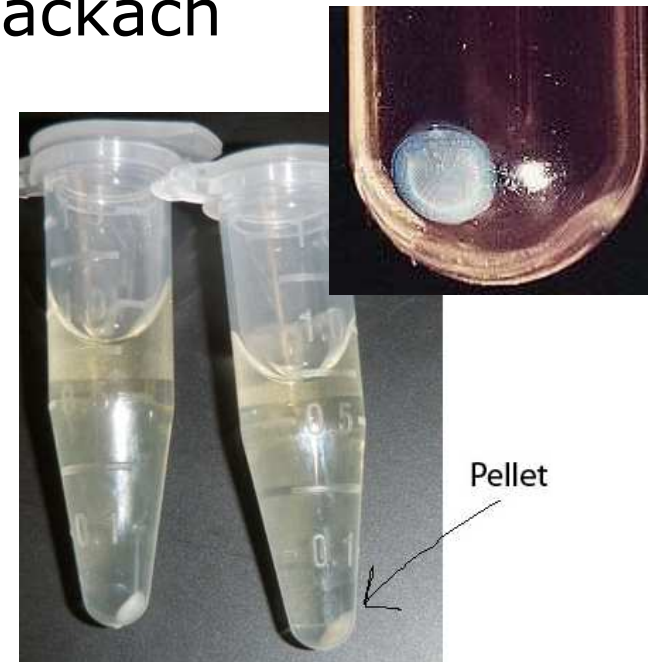
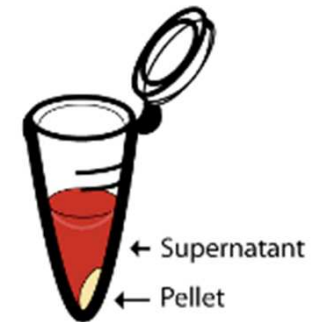
5. Přidání fenolu a následně směsi izoamylalkohol:chloroform v poměru 1:24 (ve které se rozpouští fenol a tedy vymizí z vodné fáze)
6. Rozdělení směsi na spodní organickou a horní vodnou (s DNA) fází, mezi nimi jsou vysrážené proteiny
!!!odpipetování špičkou s ustříhlým koncem (střížné síly, velikost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

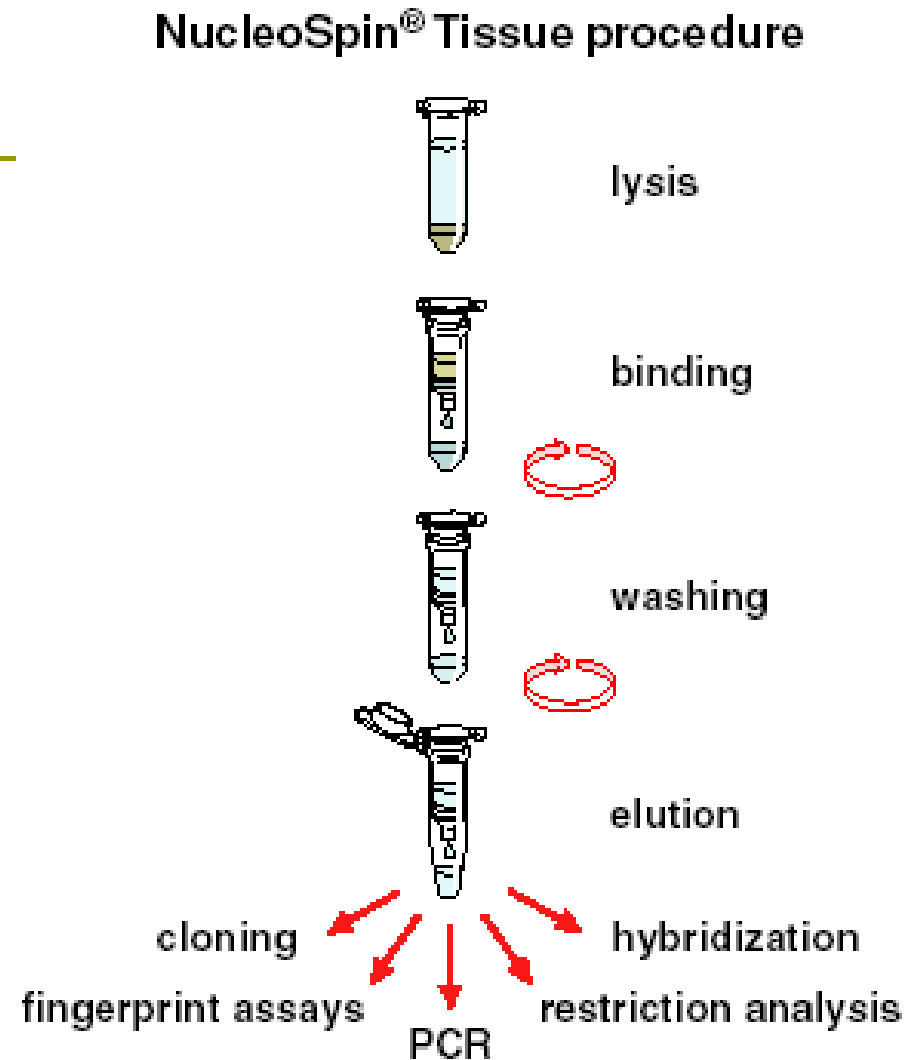


Izolace DNA - kity

- ❑ 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

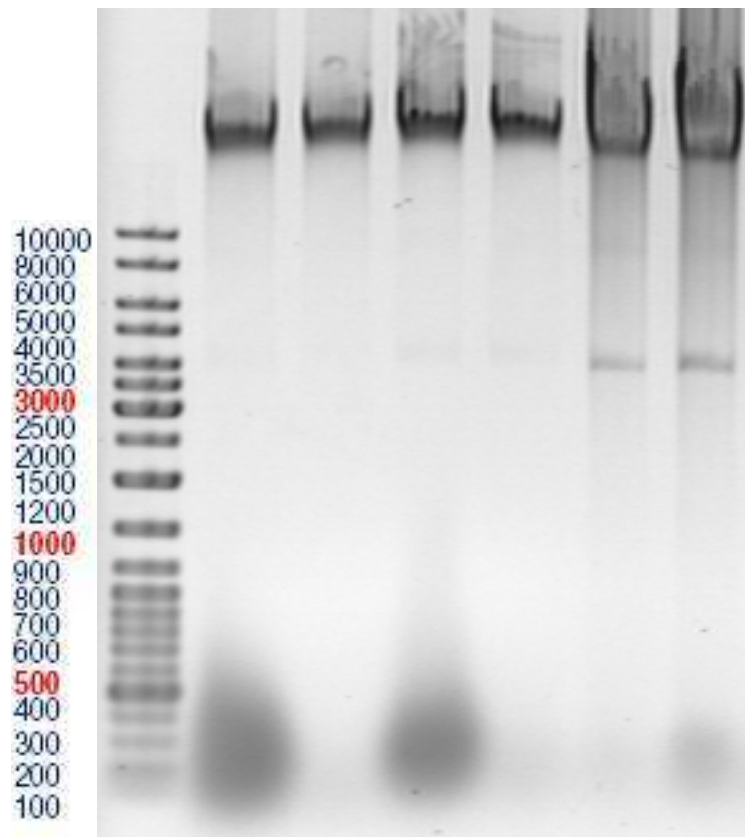
- Jednoduché
- Rychlé
(**ALE** rozbití buněčné stěny)
- Neznámé složení roztoků
- Dražší v porovnání s fenolovou metodou
- Nutno dokoupit enzym a namíchat roztoky



Macherey-Nagel (Německo)

Kontrola

□ Gelovou elektroforézou



← plazmid.DNA

M – velikostní standard

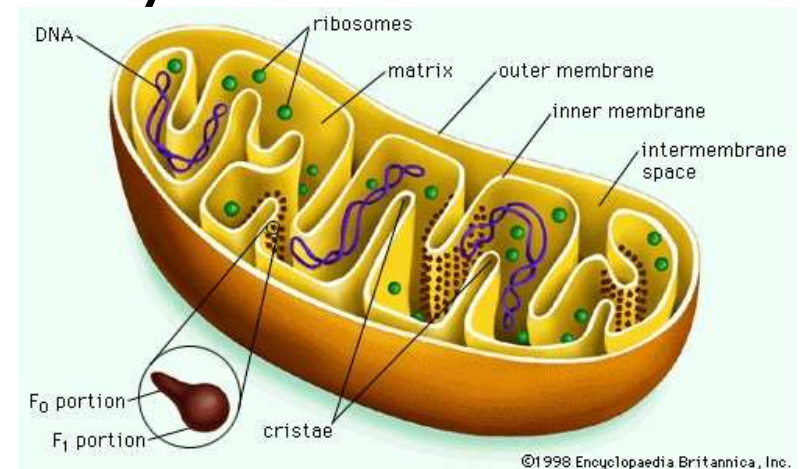
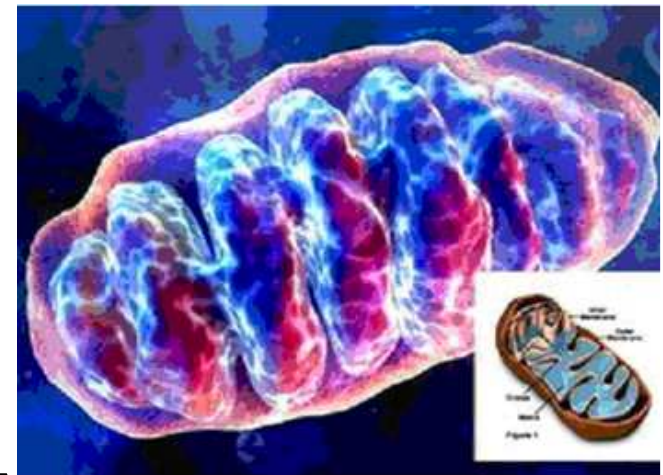
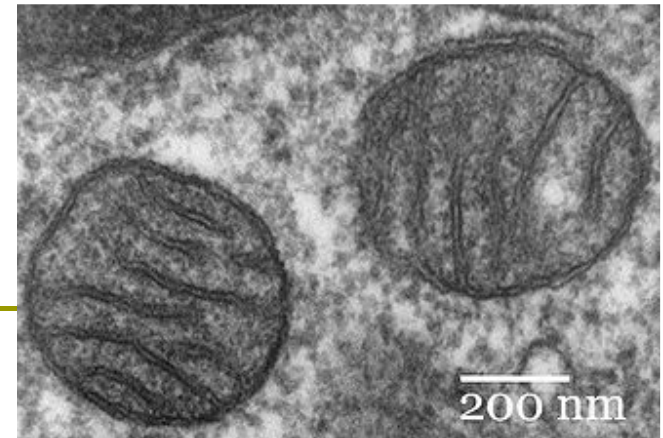
1,3 – hrubý lyzát před přidáním RNázy

2,4 – hrubý lyzát po přidání RNázy

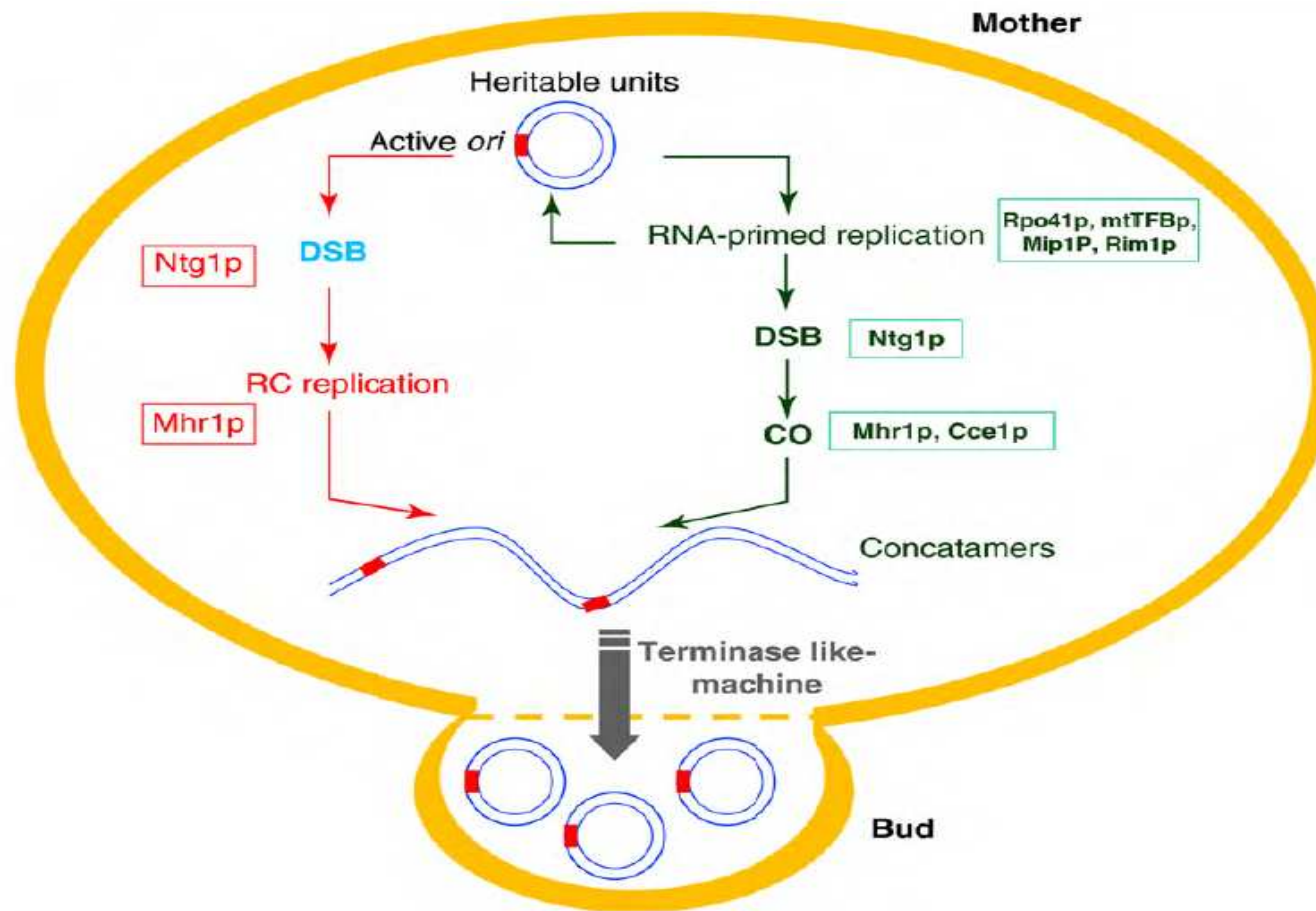
5,6 – přečištěná DNA

Mitochondrie kvasinek

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



Replikace mitochondrií

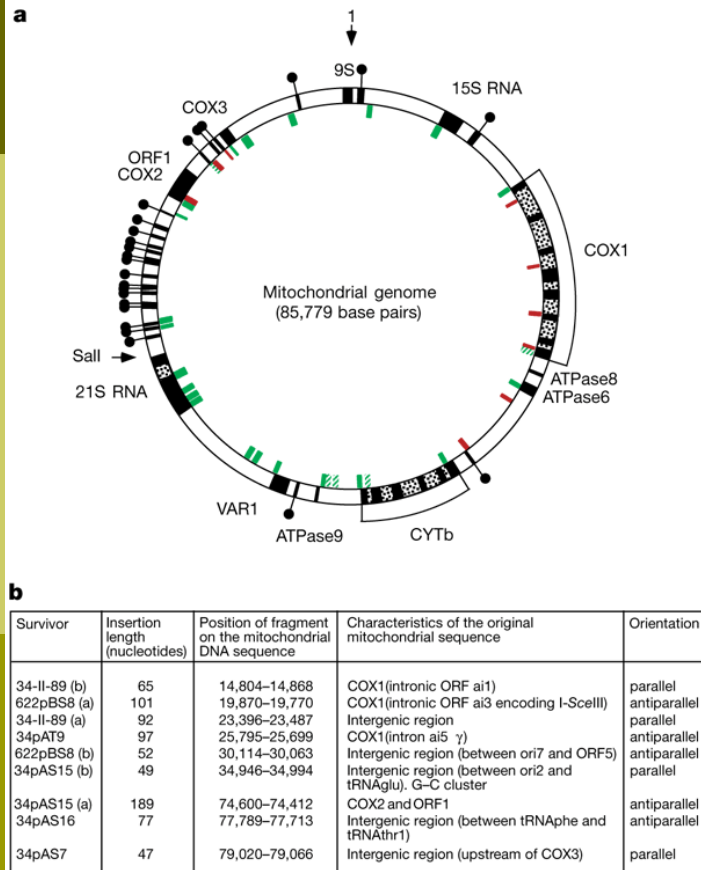


(Solieri. 2010. *Trends in Microbiol.* 18:521-530)

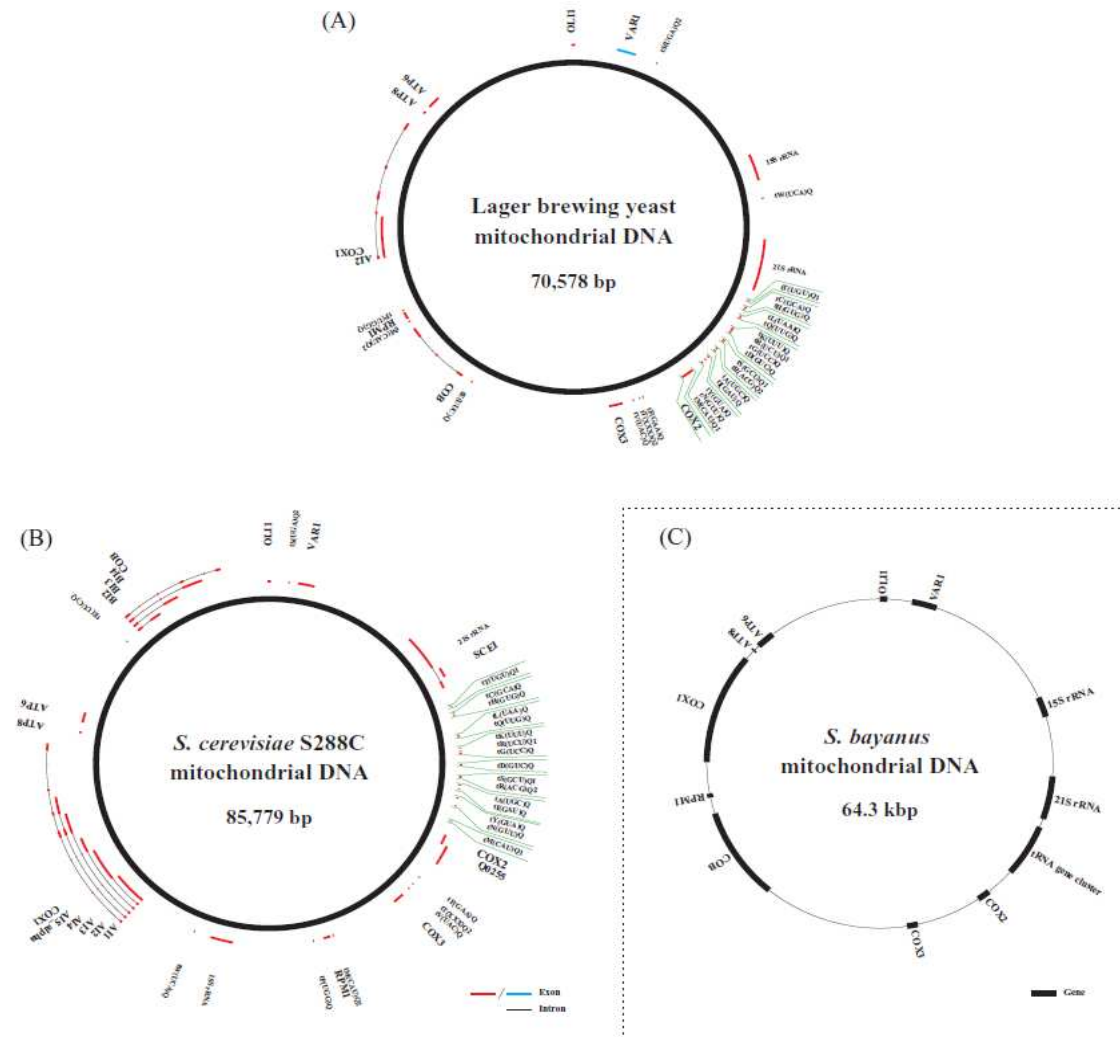
mtDNA

- 85 779 bp u *S. cerevisiae*
- 70 578 bp u *S. pastorianus*
- 64 300 bp u *S. bayanus*
- Různá velikost, pořadí genů, ...
- Identifikace – RFLP, štěpení genů pro cytochrom oxidázu, ...

mtDNA u rodu *Saccharomyces*



(Ricchetti et al. 1999. *Nature*. 402: 96-100.)



(Nakao et al. 2009. *DNA Research*. 16:115-129)

Pořadí genů na mitochondrii

(*Saccharomyces sensu stricto*; Groth et al. 2000)

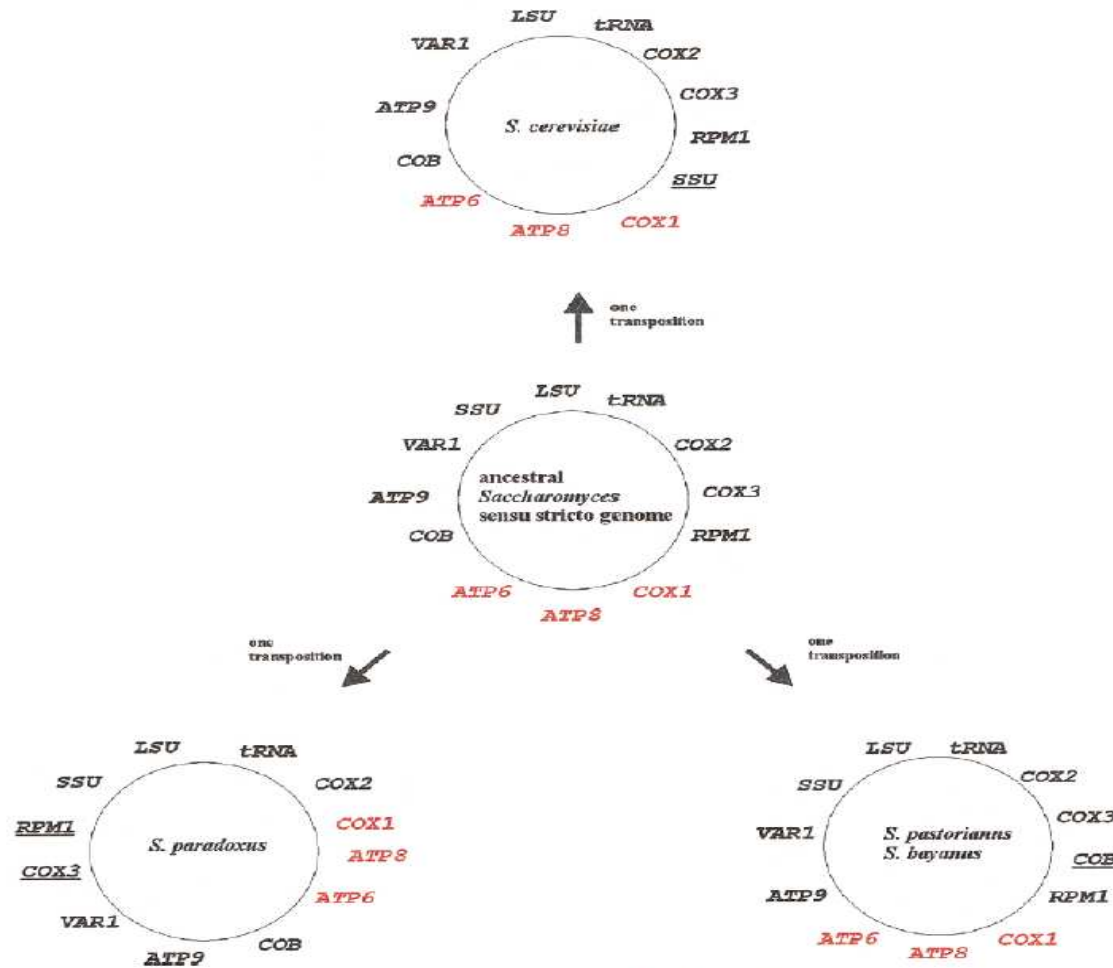
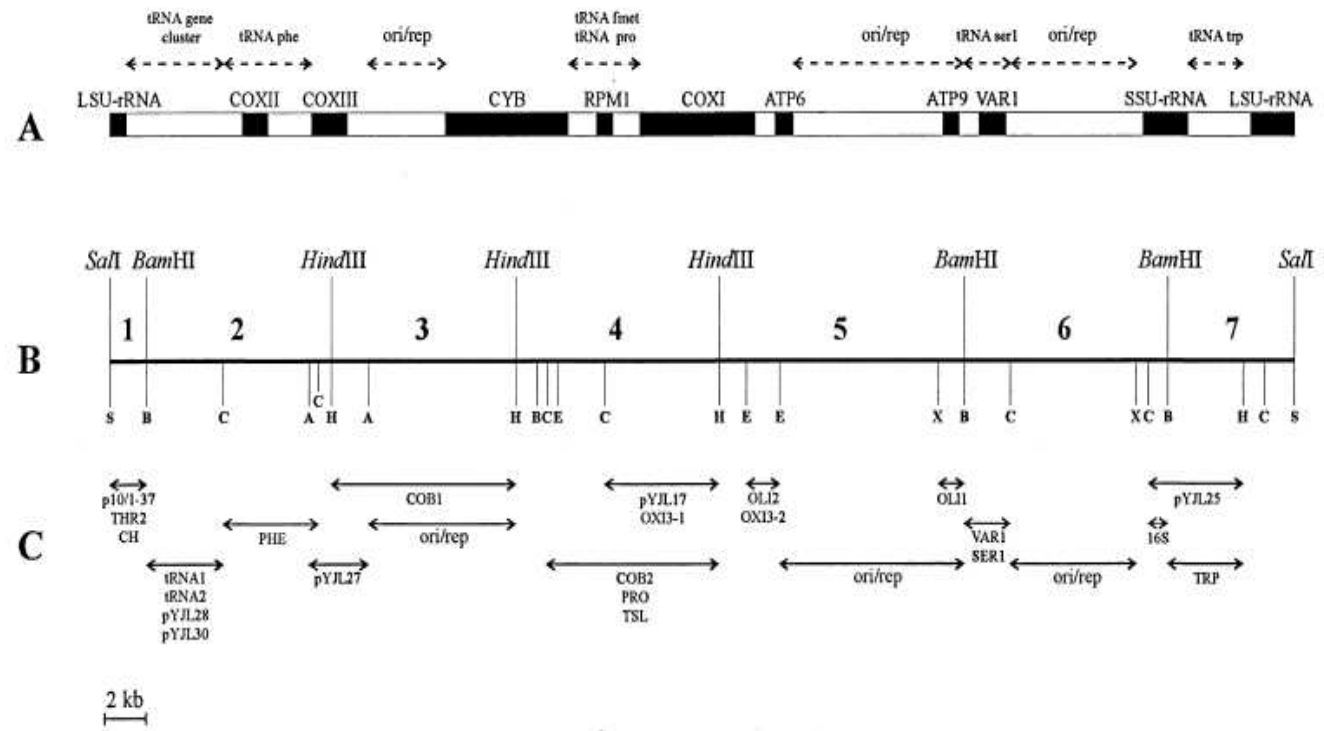


FIG. 3.—The origin of the *Saccharomyces sensu stricto* (A) and *sensu lato* (B) mitochondrial genome gene order. The *sensu stricto* progenitor molecule has given novel gene order configurations by a transposition mechanism. The “transposed” genes are underlined. The relationships among some *sensu lato* mtDNAs suggest that rearrangements have taken place via transpositions and/or inversions. However, note that while transpositions can preserve the orientation of the transposed transcription units, inversions always change it. The genes involved in “transpositions” and/or “inversions” are underlined. Note that *ATP6*, *ATP8*, and *COX1* genes (shown in red) are physically linked in all examined species.

COX geny

Fig. 1A–C Map of the mitochondrial genome of *S. uvarum*. **A** Gene order and approximate location of tRNA genes and *ori/rep*-like sequences. **B** linearized restriction endonuclease site map of the approximately 57-kb long genome of *S. uvarum*, which is arbitrarily represented as starting at the unique *SalI* site; restriction sites in the upper part produce the seven fragments listed in Table 2. *S* = *SalI*; *H* = *HindIII*; *B* = *BamHI*; *C* = *HincII*; *A* = *AccI*; *E* = *EcoRI*; *X* = *XbaI*. For *AccI* and *XbaI* only some of the sites have been reported. **C** indication of the smallest restriction fragments hybridizing to the probes listed in Table 1

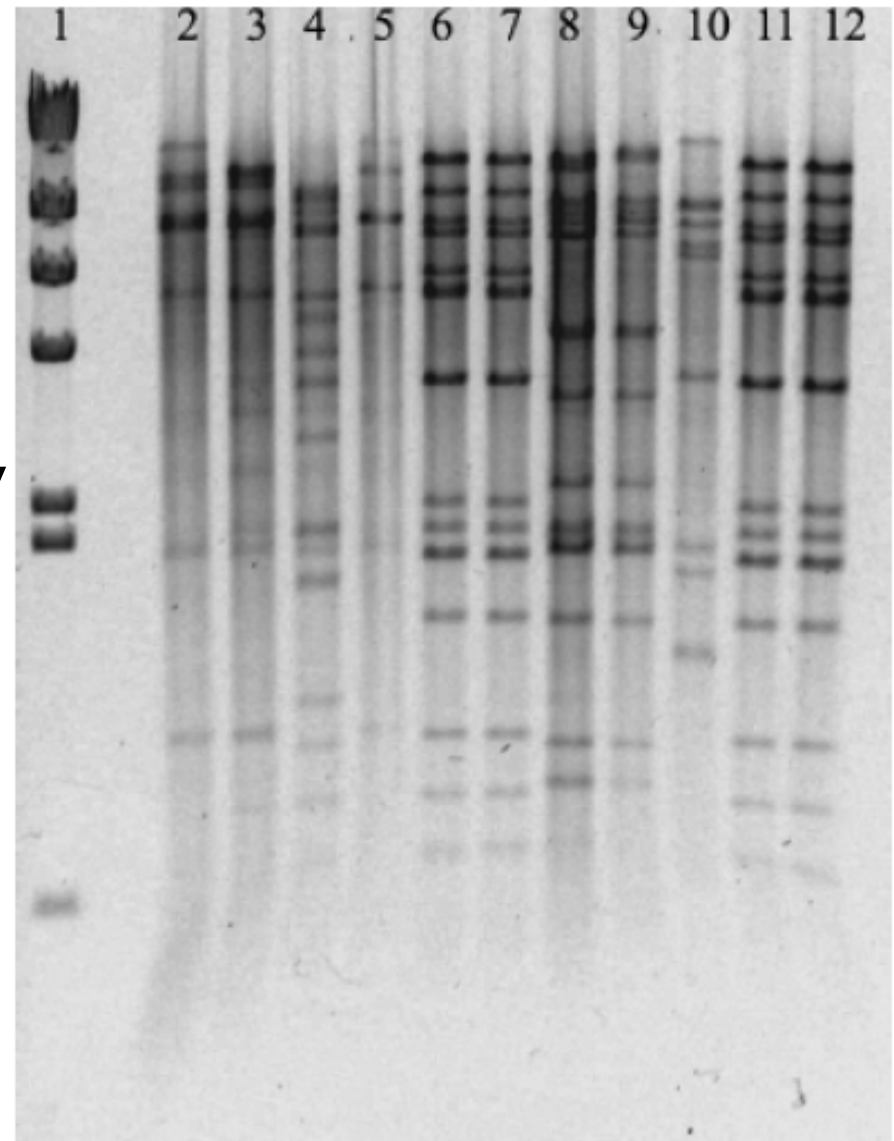


RFLP mtDNA

□ Jiné % G+C oproti chromozomální DNA

→ vhodné restriční enzymy

(Rainieri et al. 2008. *FEMS Yeast Res.* 8:586-596)



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