

Osnova předchozí přednášky

Trochu historie

výskyt kvasinek

- výroba piva, vína

medicínský význam

- kandidozy

modelový organismus

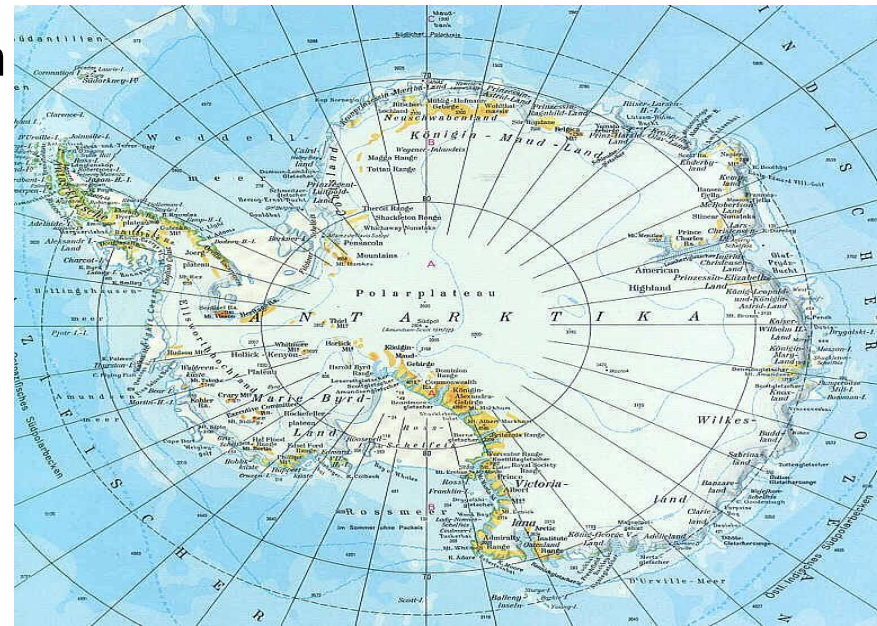
Morfologie kvasinek

Identifikace kvasinek

Metody detekce kvasinek

Metody využívající kvasinek

Určení (nových) kmenů nových lokalitách



Určení kmene v klinických izolátech (odlišení patogenních kmenů *Candida*...)



Kontrola čistoty kmene pro biotechnologické procesy (*Saccharomyces cerevisiae* – pivo)

Zpracování vzorků

- zpracování vzorků:

→ z půdy: promývání v destilované vodě → homogenizace → třepačka ...

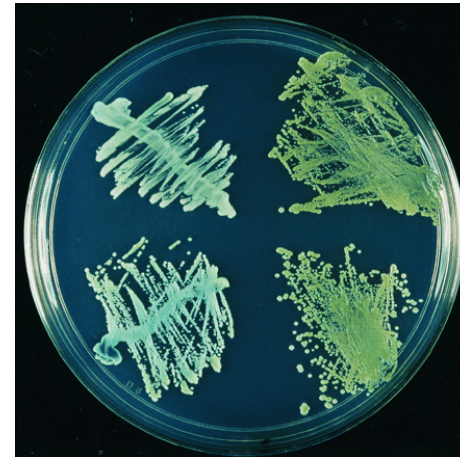
→ klinické vzorky stěrem nebo pomocí lepidivé pásky ...

a pak vyšetí na Sabouraudův agar nebo YPD médium → kultivace 3-7 dní při teplotách 22-25 °C



- identifikace:

fenotypové metody – morfologie kolonií, morfologie buněk, biochemické vlastnosti (fermentace cukrů, asimilace dusíkatých substrátů...), růst na chromogenních plotnách (*Candida* zelená)



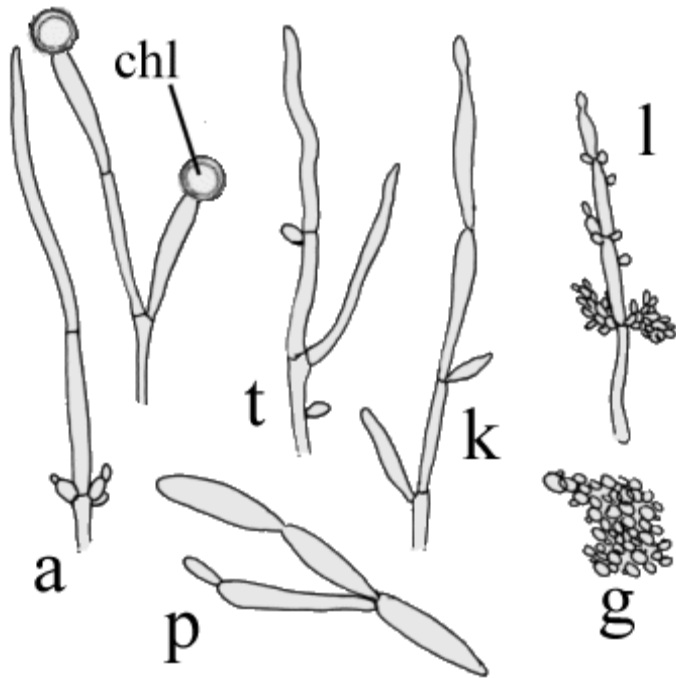
- moderní metody

PCR (nested, multiple, RFLP),
sekvenační (454 technologie),
hmotnostní spektrometrie

Identifikace kvasinek

- Morfologie – rozlišení jednotlivých druhů: charakteristika tvaru, velikosti, povrchu..., asexuální a sexuální struktury,...
- rozdělení dle způsobu pohlavního rozmnožování (asko-vřecko, basidio-stopkovýtrusé a deuteromycetes; basidiosporogenní produkují ureasu – na močovině s fenolčervení se barví červeně ...)

Tvorba zárodečných klíčků při 39°C

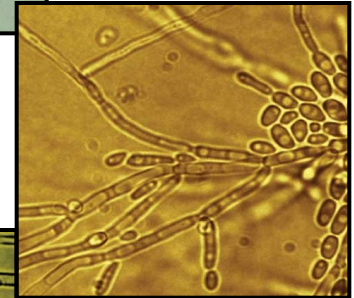


a = albicans, t=tropicalis, k=krusei, l=lusitaniae,
g=glabrata, p=parapsilosis; chl=chlamydo-spore

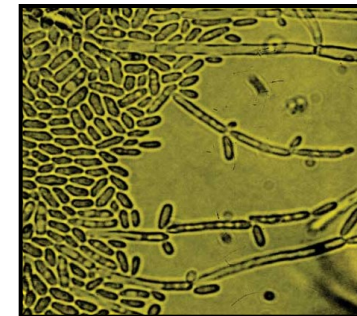
C.albicans



C.tropicalis



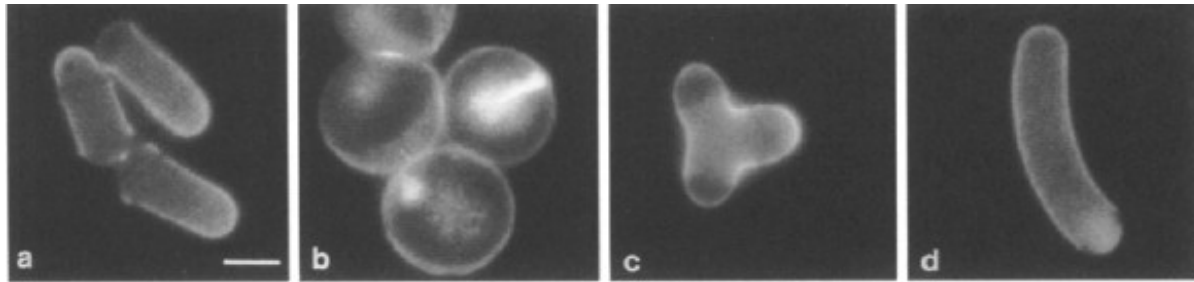
C.krusei



Molekulární taxonomie

-konvenční taxonomie je problematická :

- morfologie kvasinek není stabilní→ roztěr a nárůst trvá několik dní (prodlužuje se včasná diagnóza ...)
- Většinu fyziologických charakteristik lze zvrátit mutací v jediném genu

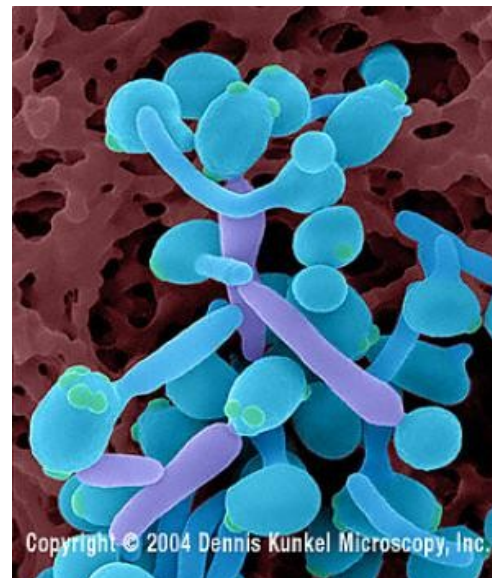


molekulární taxonomie (komerční účely - odlišit kmeny *S.c.*)

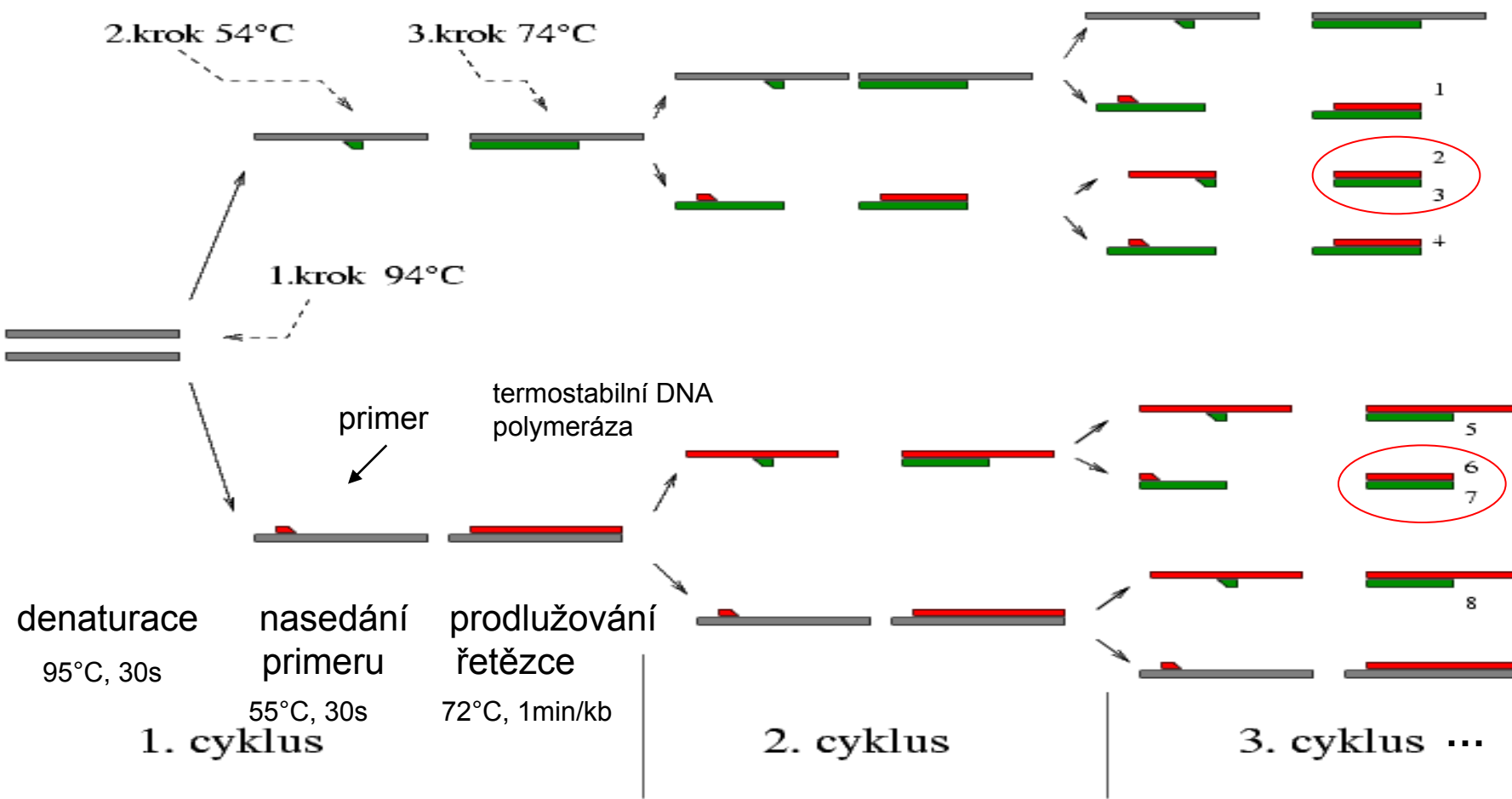
- pulsní gelová elektroforéza, FISH (karyotyp)
- PCR a restrikční polymorfismus (odlišení druhů)
- nejnověji MALDI-TOF (taxonomie)

Identifikace založená na odlišnosti typických sekvencí DNA

- obtížná izolace DNA, proteinů ... z kvasinek
- je třeba nejdříve narušit silnou buněčnou stěnu ... pomocí enzymů nebo mechanicky a poté extrahovat DNA (např. fenol-chloroform, poté srážení etanolem)
- specifické sekvence lze poté identifikovat pomocí Southern blotu nebo PCR
 - izolace DNA a štěpení restriční endonukleázou -> agarozový gel -> přesátí na membránu -> sonda značená digoxigeninem (většinou se využívá sekvencí rDNA)

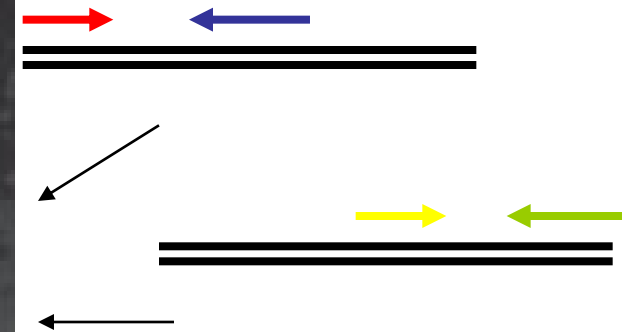
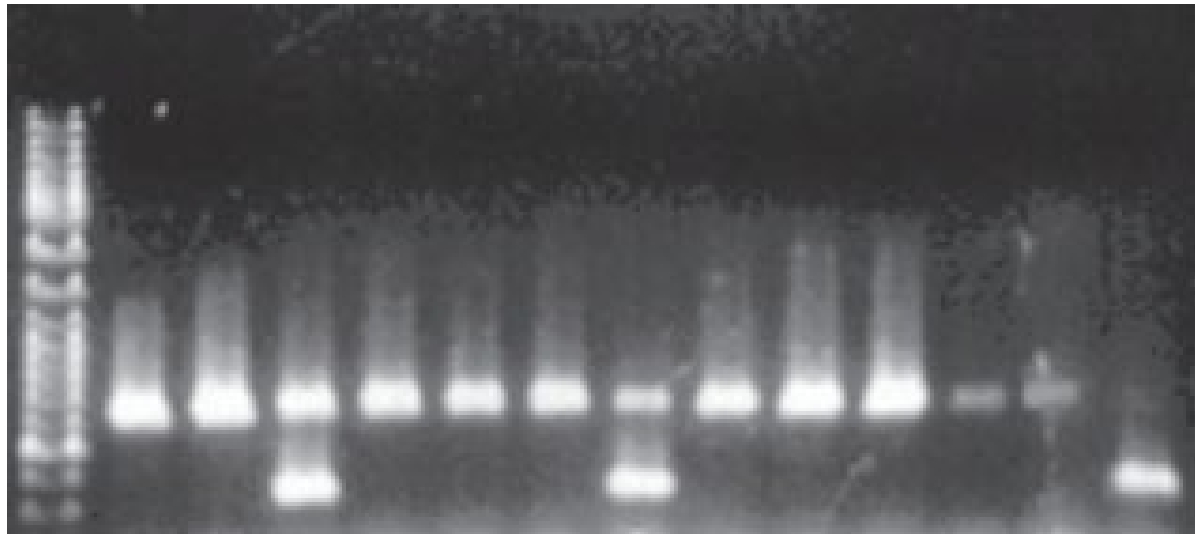


Polymerázová řetězová reakce (PCR)

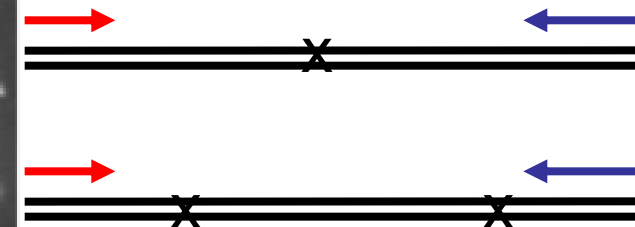
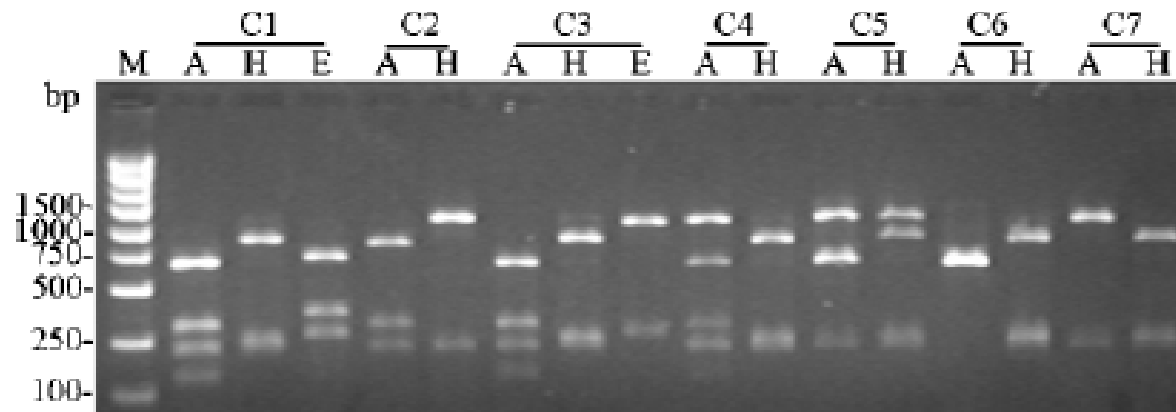


25-35 cyklů v termocykleru

- 1. sada primerů je universální kvasinková (pozitivní kontrola, vyšší proužky) a 2. sada primerů je druhově specifická (méně konzervovaný úsek DNA) - separace gelovou elektroforézou (barvení ethidium bromidem, UV transiluminátor)

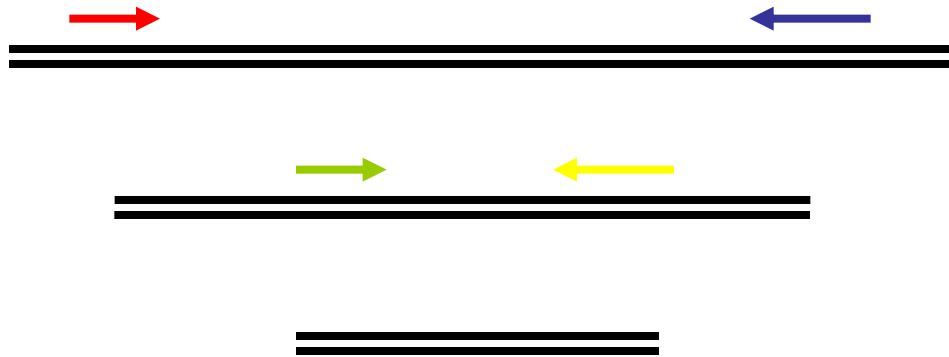


- po PCR může následovat štěpení restriční endonukleasou a odlišení druhů na základě odlišné délky štěpných produktů (tzv. **RFLP** – restriction fragment length polymorfism)



Nested („zahnížděná“) PCR

- amplifikace probíhá dvoufázově
- v 1. fázi je pomocí jedné sady primerů namnožena delší sekvence nukleové kyseliny
- takto získané amplikony jsou pak přeneseny do jiné amplifikační zkumavky obsahující druhé dvojici primerů, specifických k vnitřní oblasti úseku amplikonů
- konzervovaná intergenová oblast rDNA
- detekce gelovou elektroforézou
- eventuálně sekvenace



- 2 sady primerů, intergenová oblast rDNA

Species and primers used		Sequence (5'U 3')	Annealing temperature (°C)
<u>First PCR for six <i>Malassezia</i> species[†]</u>	Forward	ATCCTTTGCAGACGACTTGA	55
	Reverse	TGCTTAACTTCGCAGATCGG	
<u>First PCR for three <i>Malassezia</i> species[‡]</u>	Forward	ACCTGCAGAAGGATCATTAGTGA	56
	Reverse	TCCTCCGCTTATTGATATG	
First PCR for each <i>Malassezia</i> species			
<u><i>M. dermatis</i></u>	Forward	CGCACCTTGCGCTCCATGGT	58
	Reverse	AGCCTGGTTTCCCAGGCAGCGG	
<u><i>M. furfur</i></u>	Forward	TGTGTACCATAGGCACCCAC	58
	Reverse	CACGGTGATAAAGGGATGCA	
<u><i>M. globosa</i></u>	Forward	TCGAGTGCATACCACACTCGAG	57
	Reverse	TACGGTGCTTTCACGGTTCT	
<u><i>M. japonica</i></u>	Forward	CGTATGTGGATCTTATCCTAT	44
	Reverse	TGACTAGTGTCGTAGGCACGGTA	
<u><i>M. obtusa</i></u>	Forward	CATGGTCCATCTCCCACACA	60
	Reverse	AGAGAGTGCGTGGCGCATGGT	
<u><i>M. restricta</i></u>	Forward	CGACCTAGTCGACTACATCCTACT	55
	Reverse	TTCGGAGATAACAAGCCTCCAT	
<u><i>M. slooffiae</i></u>	Forward	ACGCACGCTAACACAACGTG	60
	Reverse	TGTGCGATTCTGAAGCGCACA	
<u><i>M. sympodialis</i></u>	Forward	CGCACCTTGCGCTCCATGGT	58
	Reverse	GGTACAATCCCCAGGCAGVAA	
<u><i>M. yamatoensis</i></u>	Forward	CGATCAAACCTTCTCTGTGTCCAG	59
	Reverse	TGTGTGGGAGGTAGAAGAGGCA	

[†]Common primers for *M. furfur*, *M. globosa*, *M. japonica*, *M. obtusa*, *M. restricta* and *M. yamatoensis*. [‡]Common primers for *M. dermatis*, *M. slooffiae*, *M. sympodialis*.

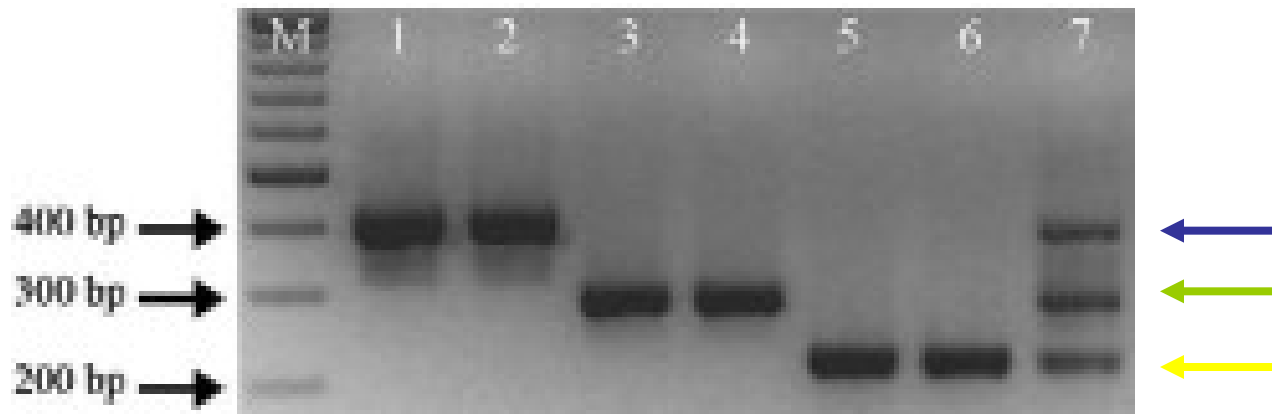
Multiplex PCR

Candida glabrata
397bp

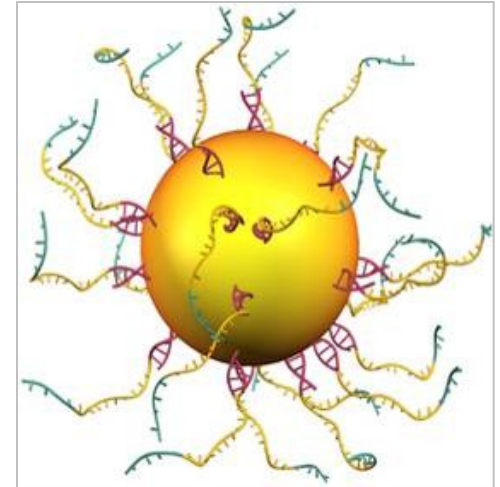
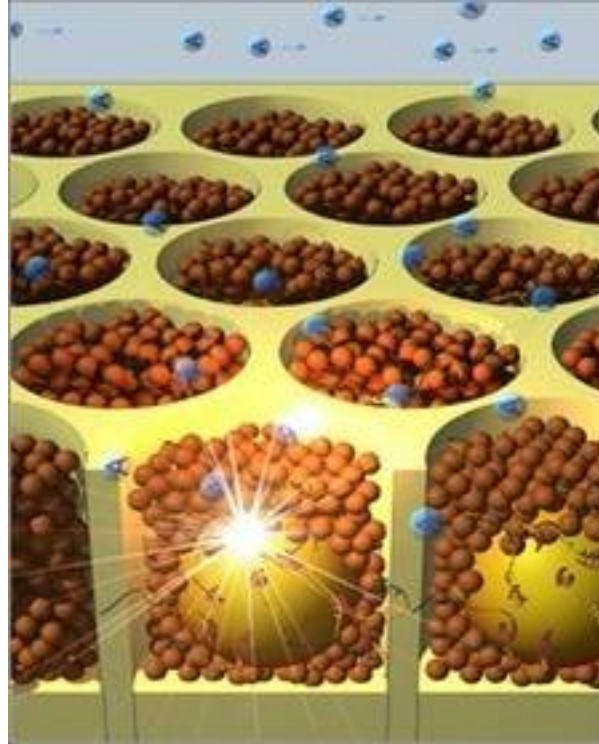
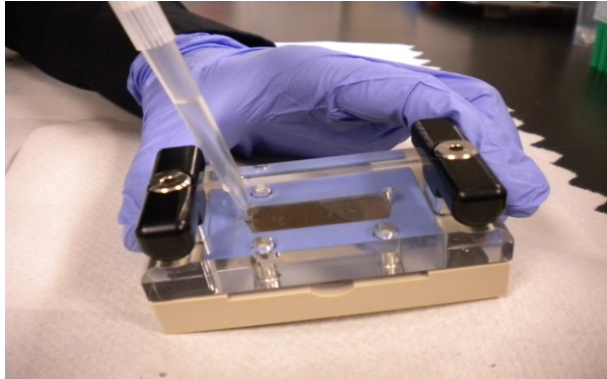
Candida nivariensis
293bp

Candida braccarensis
223bp

univerzální
primer (konzervativní oblast 5.8S rDNA)



Nová generace sekvenování

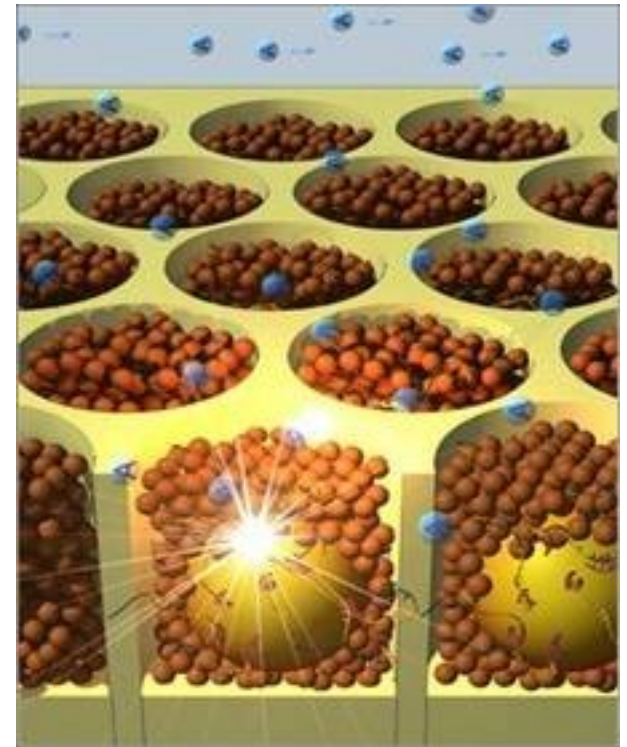
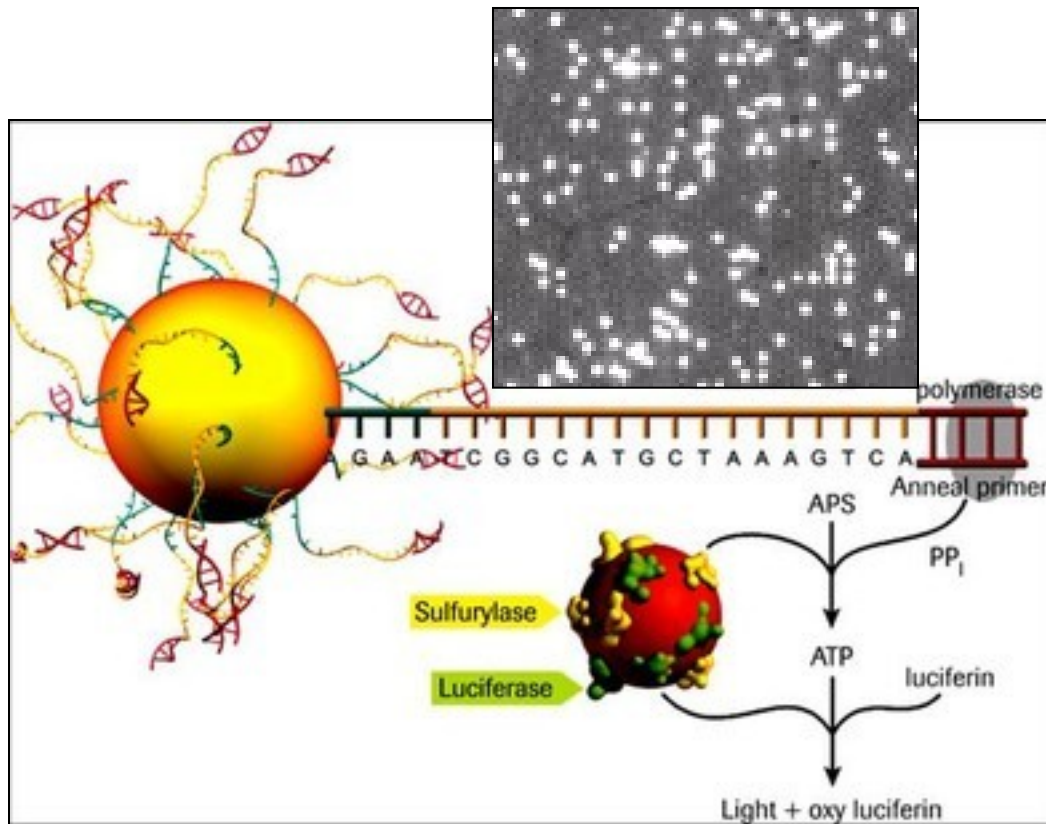


300 000 jamek každá s jednou kuličkou obsahující jedno namnožené vlákno ssDNA

Technologie 454 od firmy Roche

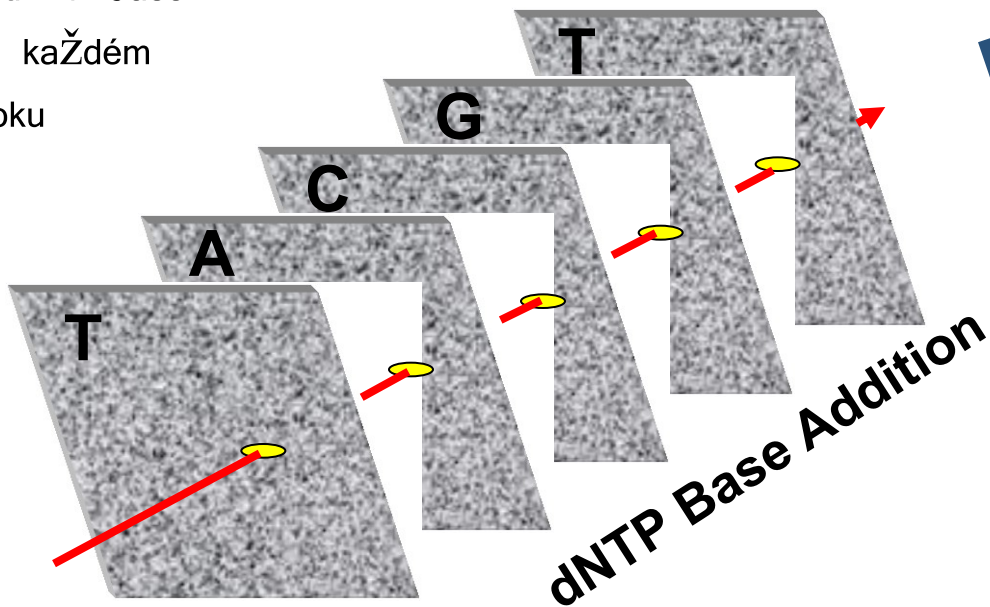
Nová generace sekvenování

Dojde k emisi světla vždy při zainkorporování komplementárního nukleotidu - nukleotid zainkorporován jako při PCR prodlužování řetězce avšak vždy je k dispozici pouze jeden nukleotid (4x opakovat – A C G T)

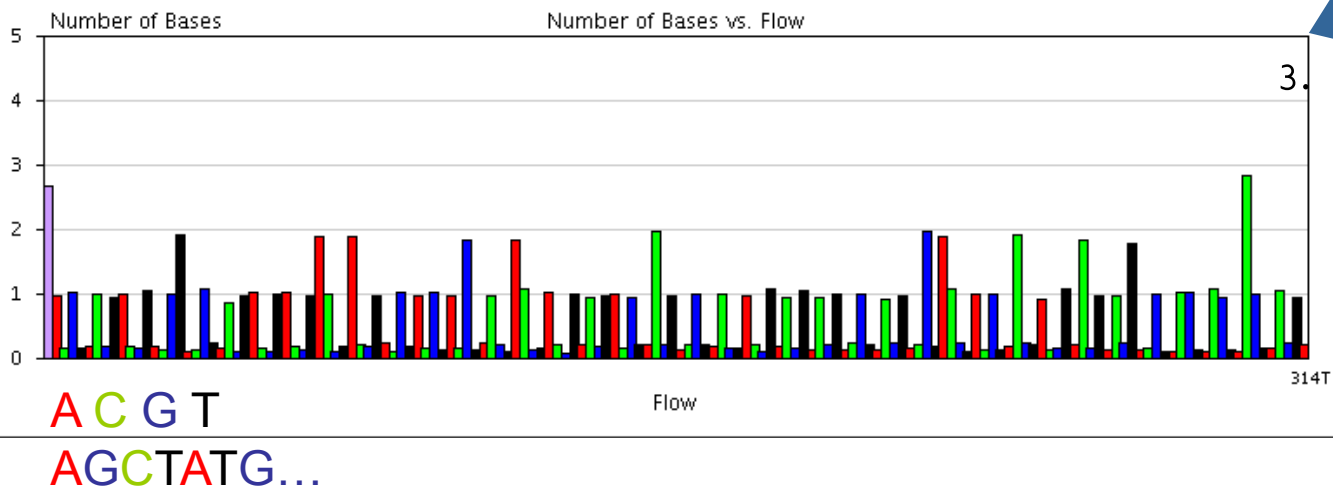


Technologie 454 od firmy Roche

1. Destička se „fotí“ v Čase po každém kroku



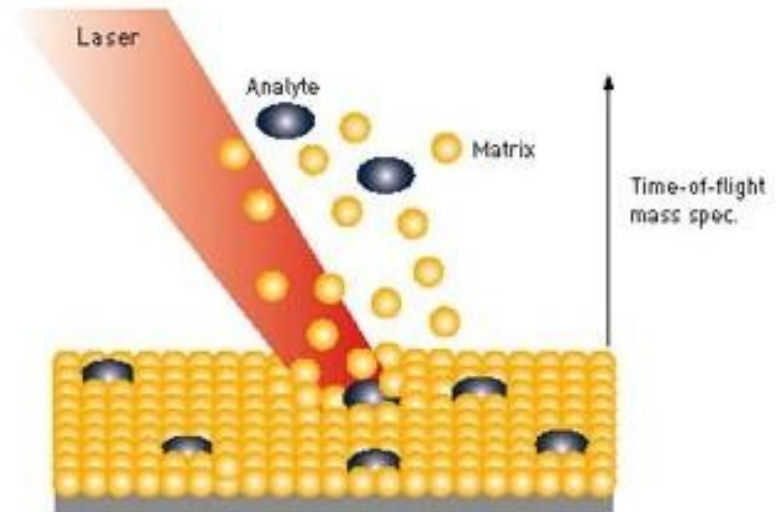
2. Snímek každé jamky se skládá do sekvence

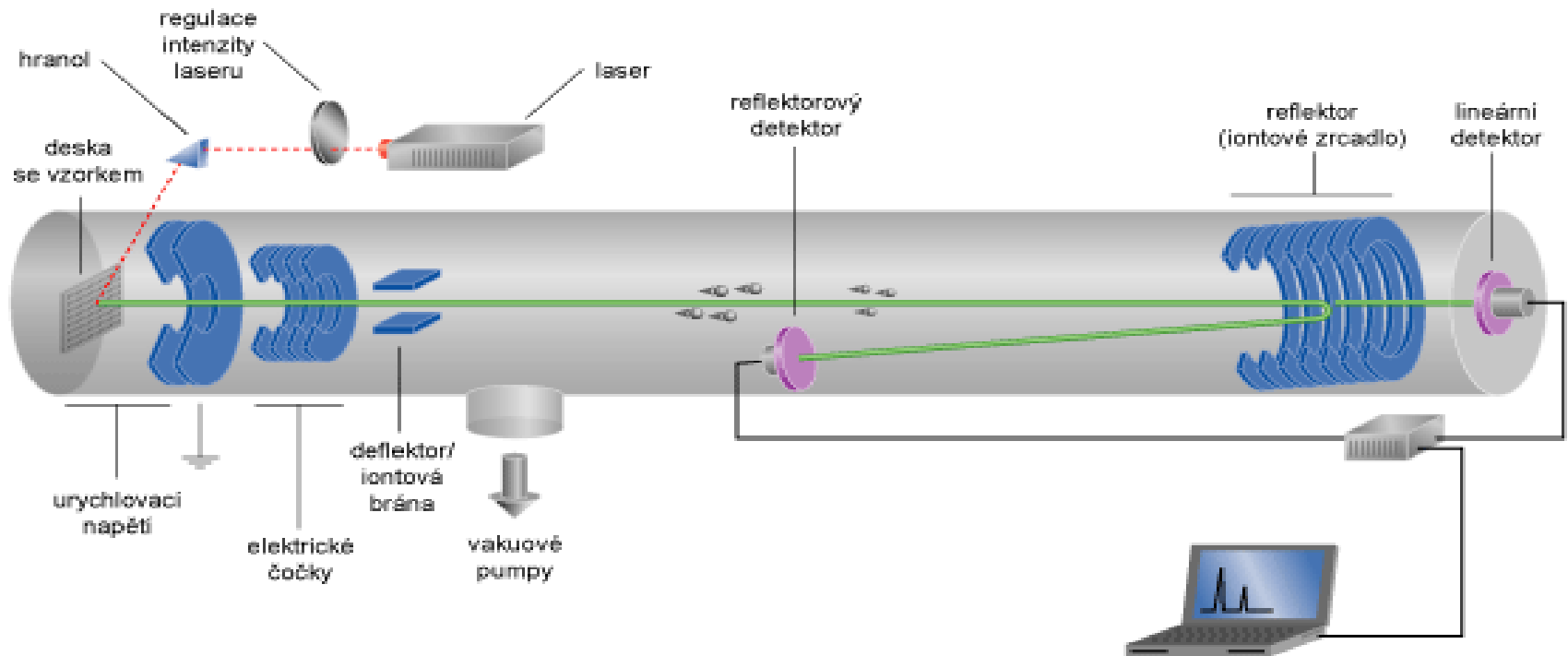


3. Síla signálu odpovídá počtu zainkorporovaných nukleotidů

MALDI-TOF

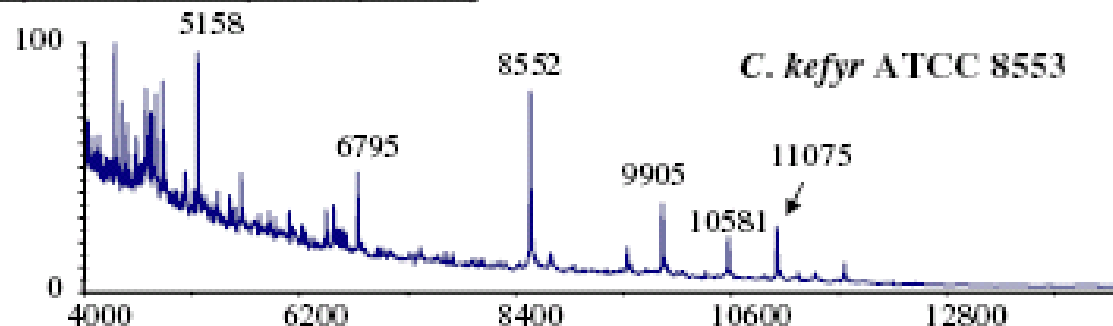
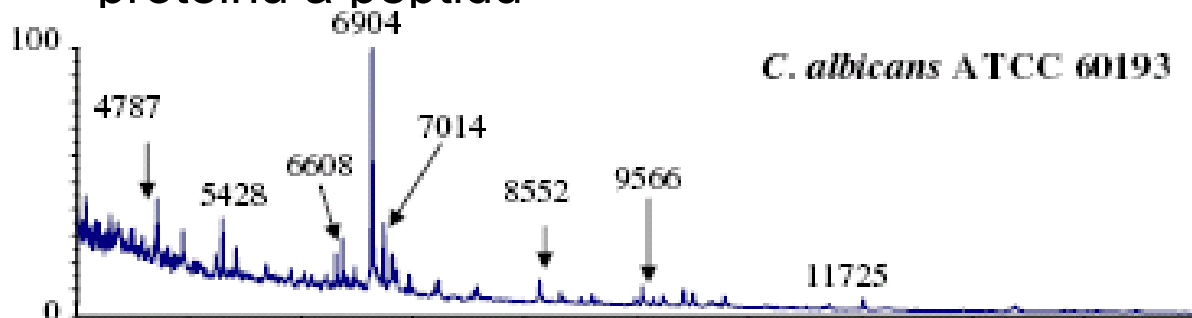
- hmotnostní spektrometrie s laserovou desorpcí a ionizací za účasti matrice s průletovým analyzátozem (matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry)
- Umožňuje odpaření a ionizaci netělné pevné fáze přímo do plynné
- Vzorek je smíchán s tzv. matricí (v molárním poměru řádově $1:10^{-4}$)
- Směs se nanese na speciální kovovou destičku a nechá zaschnout
- Destička se vloží do iontového zdroje a ve vakuu je ozářena pulsním laserem (UV)
- energii laserového pulsu absorbuje matrice a předá ji molekulám analytu – odpaří se





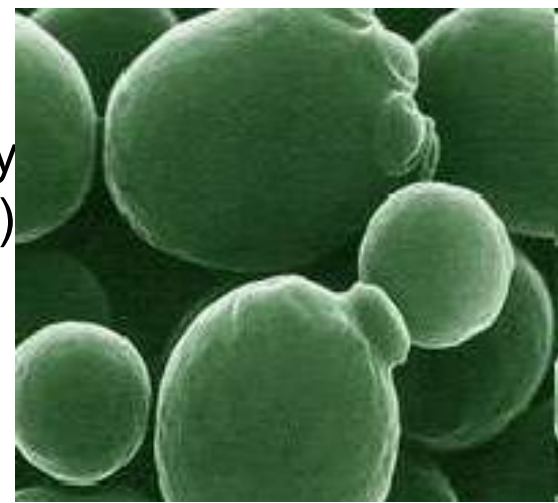
ion vstupuje do vakua v trubici detektoru - z jeho pohybu vakuovaným prostorem lze vypočítat poměr jeho hmotnosti a náboje (z doby letu částice)

- MALDI-TOF hmotnostní spektrum je zobrazením četnosti ionizovatelných částic buněčného proteomu
- Charakter spektra závisí na krystalizaci a ionizačních vlastnostech vzorku → výška píku je rovna relativní koncentraci proteinu v místě ionizace
- Při srovnávání spekter druhů uvnitř rodu se hledají rodově charakteristické signály píků
- Identifikace na úroveň kmenů možná díky detekci charakteristických proteinů a peptidů



Saccharomyces cerevisiae

- oválné, množí se pučením – >diploidní i haploidní buňky
- (rostou) většinou v G1 fázi (zatímco pombe je v G2 fázi)
- Genom 12 Mbp na 16-ti chromosomech
- Krátké centromery a ARS (100bp)
- Kóduje cca 6 275 genů (5 800 je funkčních)
- 120 kopií rRNA, 262 tRNA
- Geny reprezentují 75% celkové sekvence (kompaktní)
- <5% genů obsahuje introny (0.5% genomu), 3% transposony (46% u člověka)



Schizosaccharomyces pombe

- podlouhlé, množí se dělením - většinou haploidní buňky
- Pouze 3 kondenzované chromozomy (13 Mbp)
- Velké repetitivní centromery (40-100kb) a 1kb počátky replikace
- Má geny pro heterochromatin (*S.c.* nemá)
- Asi 4800 kodujících genů (nejméně u eukaryot)
- z nichž 43% má introny
- 50 genů má homologie s geny lidských nemocí



<http://www.yeastgenome.org/>

<http://www.sanger.ac.uk/modelorgs/yeast.shtml>

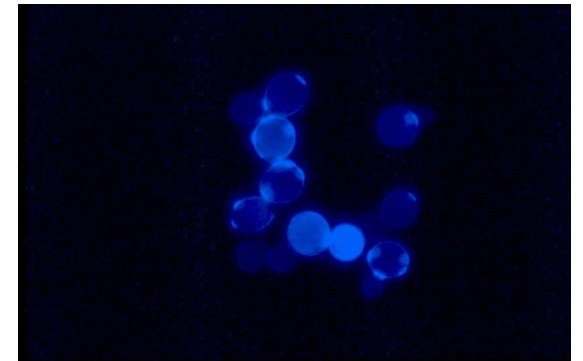
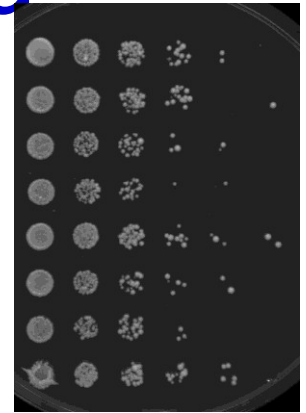
Výhody kvasinkového modelu

- Rychle se množící **EUKARYOTNÍ** mikroorganismy (90 min/dělení, 25-30°C)
- Vytváří kolonie na plotnách - mikrobiologické metody (otiskování ploten, kapkový test =>toxiny v plotnách – HU, MMS ...)
- Stabilní haploidní i diploidní formy
- Haploidní buňky lze křížit na diploidní (heterozygotní mutanty)
- Diploidní buňky lze sporulovat a využít pro genetickou analýzu (tetrádová analýza)
- Lze transformovat DNA (plasmidy i lineární)
- Centromerické a multicopy plasmidy
- Vysoká frekvence homologní rekombinace (lineární DNA)
- Lze připravovat deleční a mutantní kmeny
- Vydrží v >15% glycerolu na -70°C „indefinitely“

- Techniky barvení (cytoskelet, stěna ... + GFP *in vivo*)

- *S.c.* má kompaktní genom – knihovny s genomovou DNA (ne cDNA)
- Kompletně osekvenovaný genom (genomové aplikace)
- EuroFan projekt – delece všech *S.c.* genů (+GFP, +2-hybrid)
- Mikročipy - expresní profily za různých podmínek

- Řada životních dějů má analogii v procesech v savčích buňkách (lidské geny testovány v kvasinkách - nemoci, metabolismus, regulační mechanismy)



F. Sherman, Getting started with yeast, *Methods Enzymol.* **350**, 3-41 (2002):
http://dbb.urmc.rochester.edu/labs/sherman_f/StartedYeast.html

Chromosom III
(nejmenší)
CEN, ARS, TEL, Ty1-5
obsahuje MAT lokus

Nomenklatura pro S.c.:
YCRXXw:
Y=yeast
C= 3. chromosom
R= pravé raménko
XX=pořadové číslo
w/c=Watson/Crick

LEU2 – gen
Leu2p - protein
leu2-Δ1 – delece
leu2-1 – mutance
LEU2::HIS3 – inzerce
HIS3 genu v lokusu
LEU2

