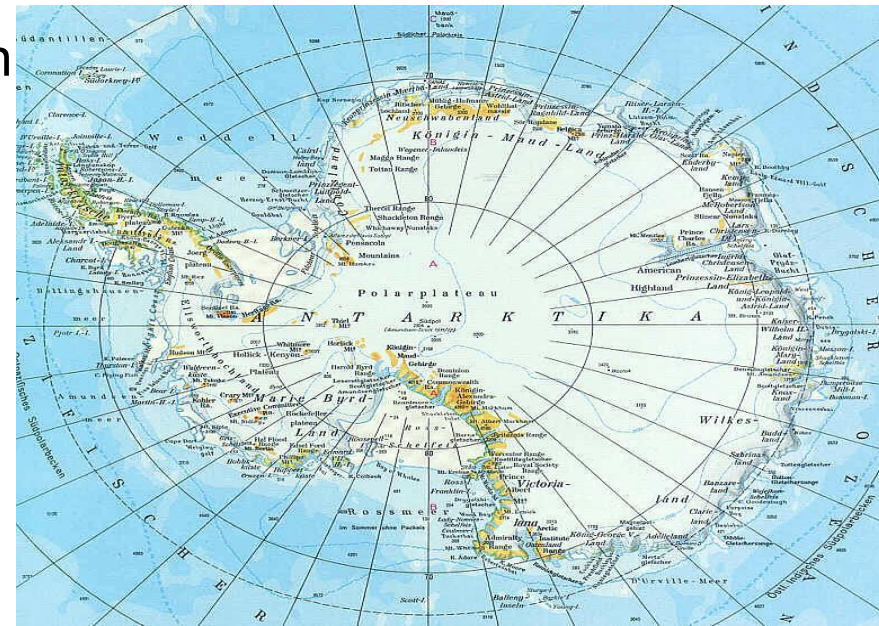


Určení (nových) kmenů v nových lokalitách



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



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

Zpracování vzorků

- zpracování vzorků:

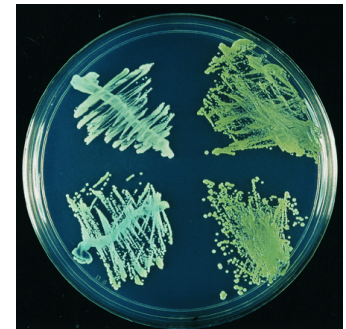
→ z půdy: promývání v destilované vodě → homogenizace → třepačka ...

→ klinické vzorky stěrem nebo pomocí lepidivé pásky ...

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



- rozdělení dle způsobu dělení a pohlavního rozmnožování
- velikost, tvar buněk i kolonií, schopnost vytvářet hyfy
- biochemické parametry (především schopnost fermentovat různé cukry)
- moderní molekulárně-biologické metody (především PCR)

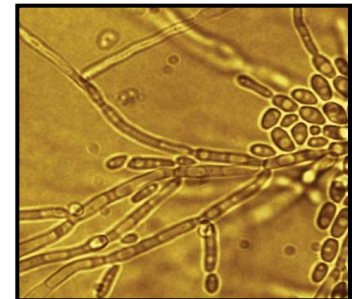


Morfologické parametry

- rozdělení dle způsobu pohlavního rozmnožování
 - asko-vřecko, basidio-stopkovýtrusé a deuteromycetes (neurčené)
 - basidiosporogenní produkují ureasu – na močovíně s fenolčervení se barví červeně ...
- morfologie – tvar, velikost, povrch ..., asexuální a sexuální struktury, ... teplotní studie....

Agar	Basis of differentiation	<i>C. albicans</i>	<i>C. dubliniensis</i>
Cornmeal–Tween 80 medium; rice agar–Tween medium; Pal’s medium	Chlamyospore production	Small numbers, occurred singly and attached terminally to pseudohyphae	Large numbers and arrangement in contiguous pairs, triplets or larger multiples attached to a single suspensor cell
Casein medium; Staib medium	Chlamyospore production	Chlamyospore absent	Chlamyospore abundant

C.tropicalis



Phenotypic criteria	<i>C. albicans</i>	<i>C. dubliniensis</i>
Growth at 42 to 45°C	+	-
Growth on hypertonic Sabouraud broth	+	-

C.albicans



Biochemické parametry

- Biochemické testy – založeny na schopnosti utilizace uhlíkatých látek (cukrů), utilizace dusíkatých látek (hydrolyza močoviny), (např. *C. dubliniensis* není schopna utilizovat D-xylózu, D-trehalózu, methyl- α -D-glukosid –chybí β -D-glukosidázová aktivita; *C. albicans* není schopna utilizovat glycerol)
- chromogení substráty

Phenotypic criteria	<i>C. albicans</i>	<i>C. dubliniensis</i>
Growth on glycerol	-	+
Growth on D-xylose	+	-
Growth on methyl- α -D-glucoside	+	-
Growth on D-trehalose	+	-
β -D-glucosidase activity	+	-



ATCC 10231(*C. albicans*) at 48 h.



ATCC 13803 (*C. tropicalis*) at 48 h.



API ID 32 C
(Bio-Mérieux)

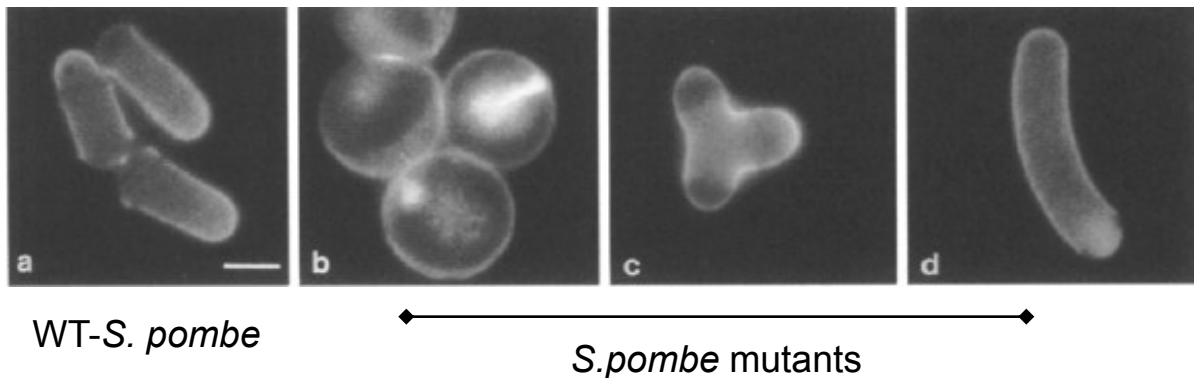
Agar	Basis of differentiation	<i>C. albicans</i>	<i>C. dubliniensis</i>
Tetrazolium salt médium	Colony color determined by the ability to reduce the tetrazolium salt	Pale pink to whitish colonies	Red to maroon colonies
Chromagar Candida (Chromagar, Paris, France; M-Tech Diagnostics Ltd, Cheshire, UK)	Colony color determined by β -N-acetylgalactosaminidase activity	Light green, light-blue or blue green colonies	Dark green colonies
Candida ID (BioMérieux, Marcy l'Etoile, France)	Colony color determined by hexosaminidase activity and other chromogenic substrate	Blue-green colonies	Dark-bluish green colonies

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 je většinou založena na odlišnosti konzervativních sekvencí jako např. rDNA

- pulsní gelová elektroforéza (PFGE), fluorescence *in situ* hybridization (FISH)

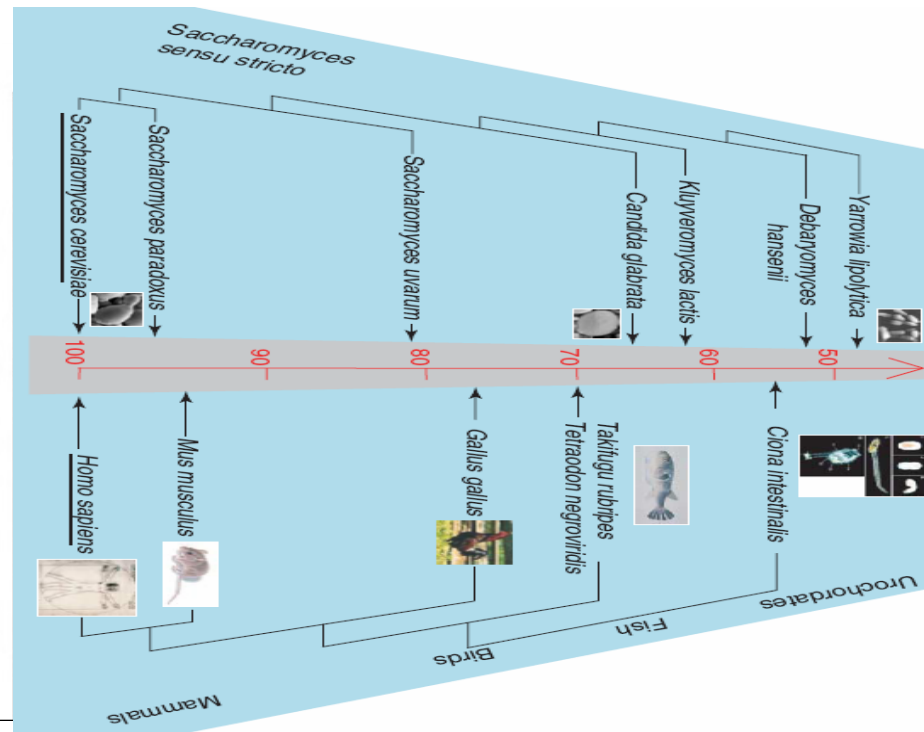
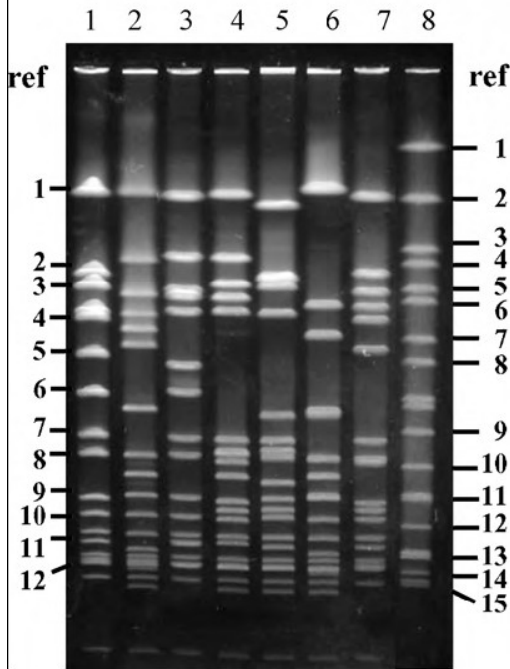
- Southern blot, PCR (restrikční polymorfismus po PCR nebo před PFGE)

- nejnověji NGS a MALDI-TOF

- obtížná izolace DNA, proteinů ... z kvasinek - je třeba nejdříve narušit silnou buněčnou stěnu (např. pomocí lysozymu) a následně izolovat DNA (např. pomocí CTAB) nebo proteiny (např. pomocí trypsinu)

Karyotypizace

- S.c. kmeny mají podobný karyotyp – většinou se liší délkou chromosomu XII (podle počtu rDNA genů)
- Průmyslové kvasinky jsou většinou polyploidní – homologní chromosomy mají odlišné velikosti
- Srovnání kmenů pro fylogenetické účely (intaktní nebo RE naštěpené chromosomy)
- Určení příbuznosti izolátů jednoho druhu pro epidemiologické účely např. kmeny z různých míst od jednoho pacienta, kmeny od 2 různých pacientů, kmeny od zdravotního personálu a pacientů



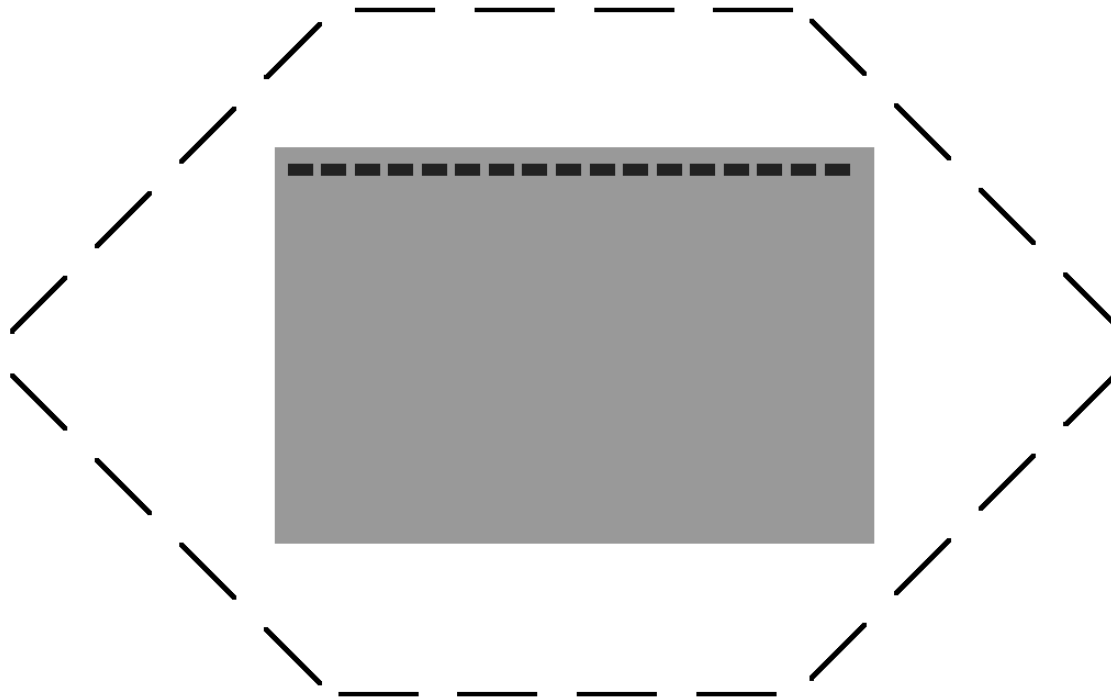
Přes značnou morfoložickou podobnost vykazují kvasinky velké rozdíly v genomu => vhodnější je analýza genomu (než morfoložických znaků)

PFGE

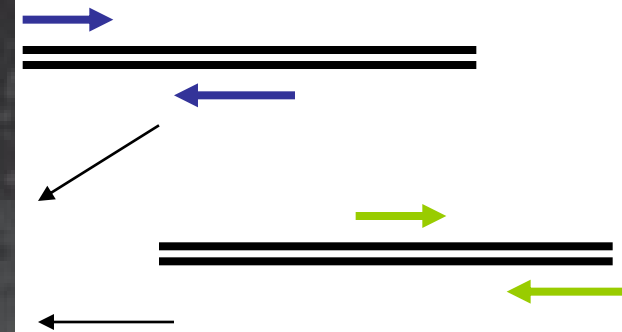
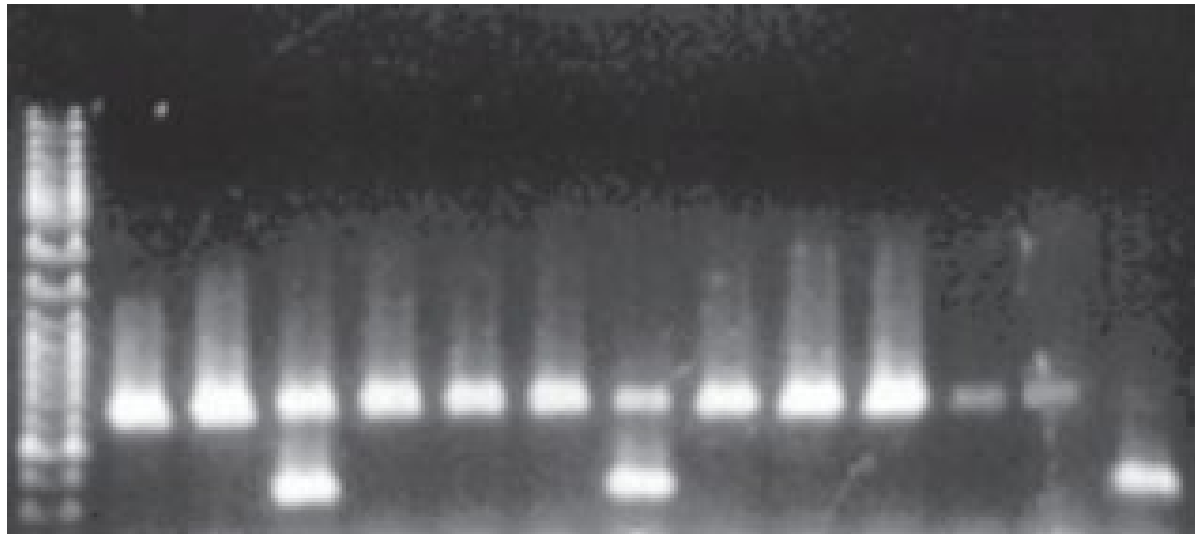
Klasická elektroforéza dokáže rozlišit fragmenty pouze do velikosti 40-50kb
(větší molekuly se pohybují stejnou rychlostí nezávisle na velikosti)

PFGE = pulse field gel electrophoresis (elektroforéza s měnícím se elektrickým polem, při změně směru elektrického pole trvá větším molekulám DNA déle, než se přeorientují - umožňuje separovat molekuly velké několik Mb)

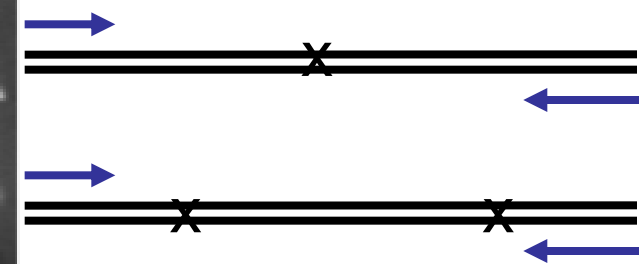
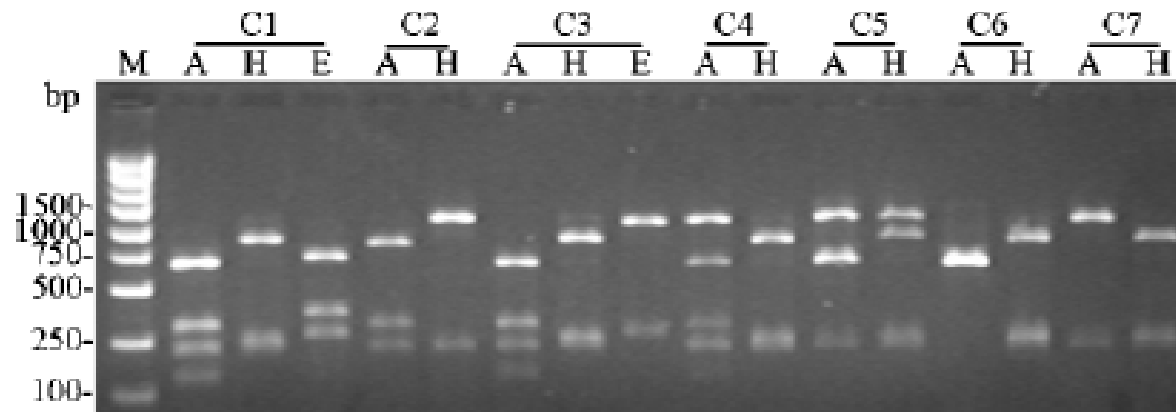
- gel obsahuje vzorky DNA uvnitř agarózových bločků (minimalizace náhodných zlomů velkých molekul DNA)



- 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)

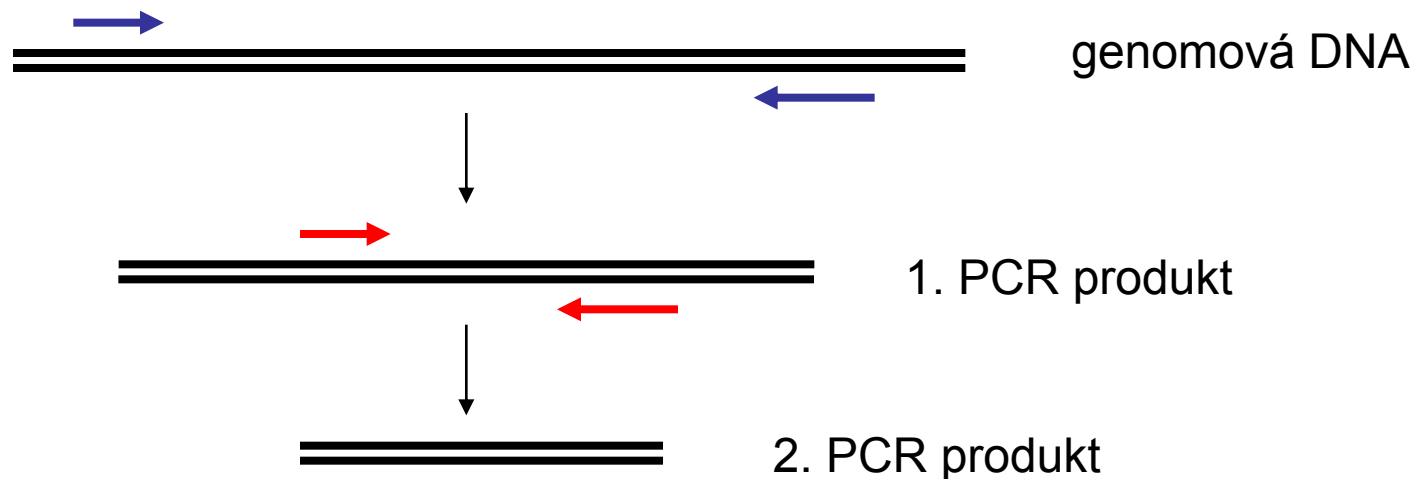


- po PCR může následovat štěpení restriční endonukleasou a odlišení druhů na základě odlišné délky štěpných produktů (tzv. **RFLP** – restriction fragment length polymorfism)



Nested („zahnízděná“) 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

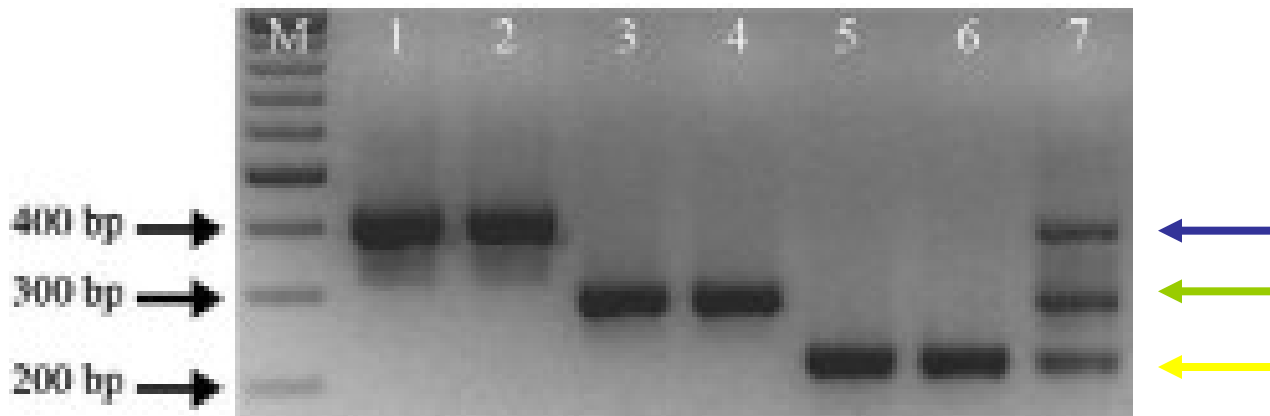
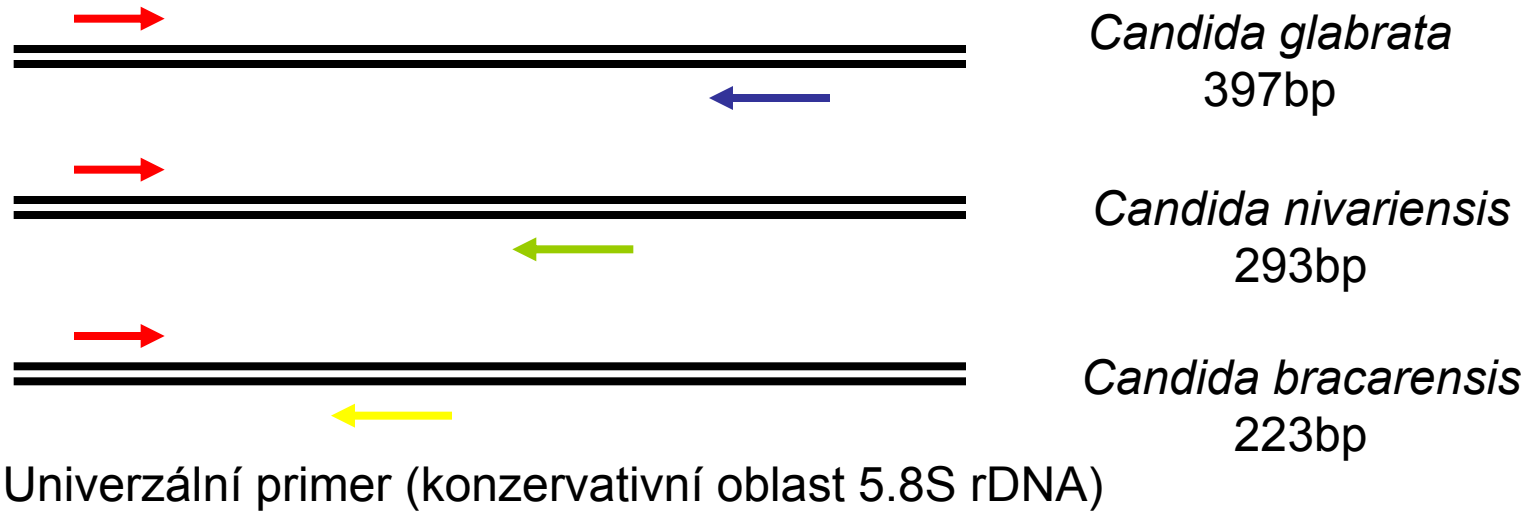


- 2 sady primerů, intergenová oblast rDNA

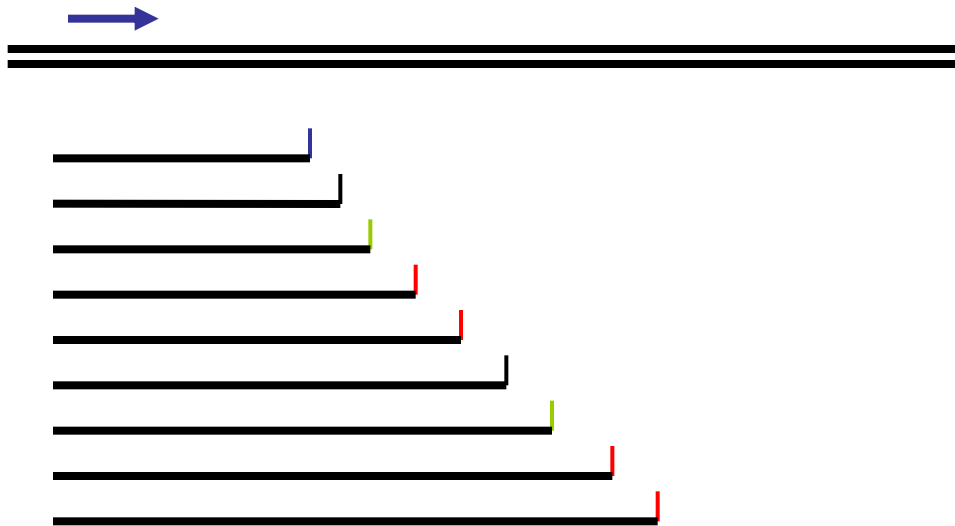
Species and primers used		Sequence (5'U 3')	Annealing temperature (°C)
First PCR for six <i>Malassezia</i> species [†]	Forward	ATCCTTTGCAGACGACTTGA	55
	Reverse	TGCTTAACTTCGCAGATCGG	
First PCR for three <i>Malassezia</i> species [‡]	Forward	ACCTGCAGAAGGATCATTAGTGA	56
	Reverse	TCCTCCGCTTATTGATATG	
First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

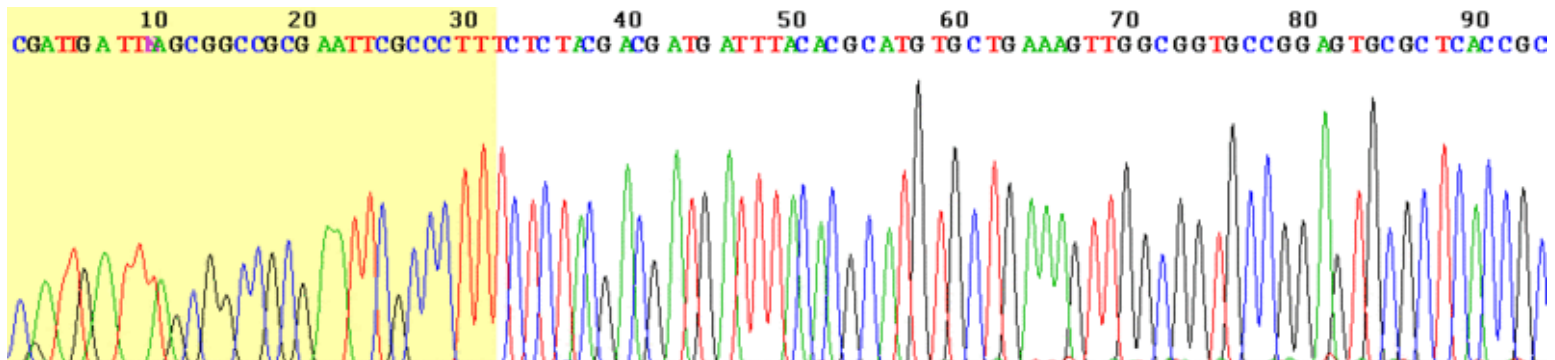


Sekvenování



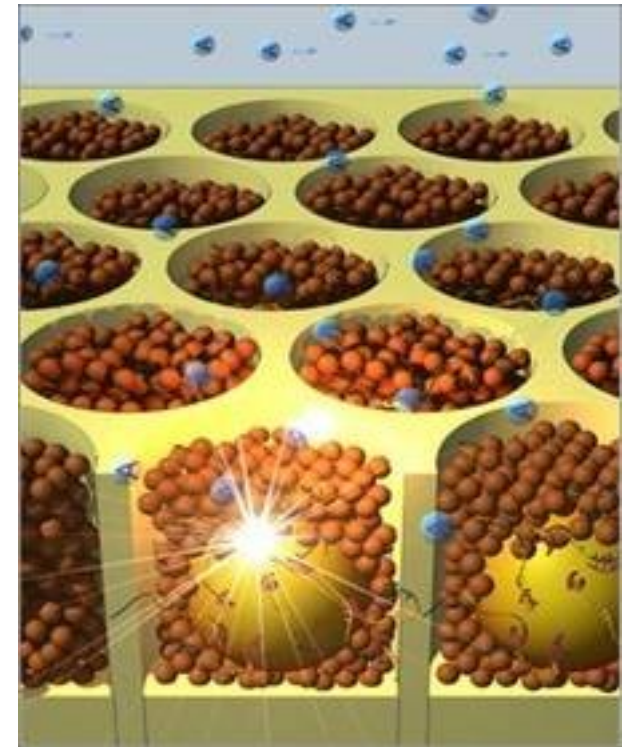
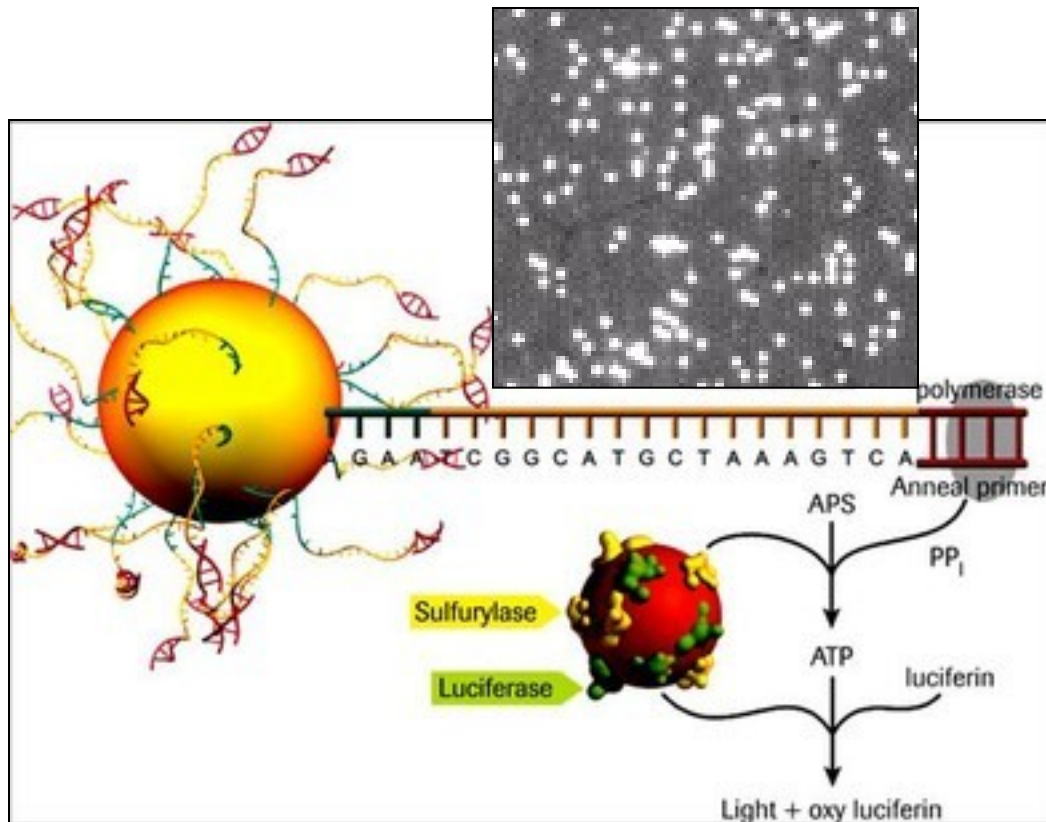
Různě fluorescenčně značené ddNTP (zablokují PCR reakci)

Produkty rozděleny kapilární elektroforézou dle délky



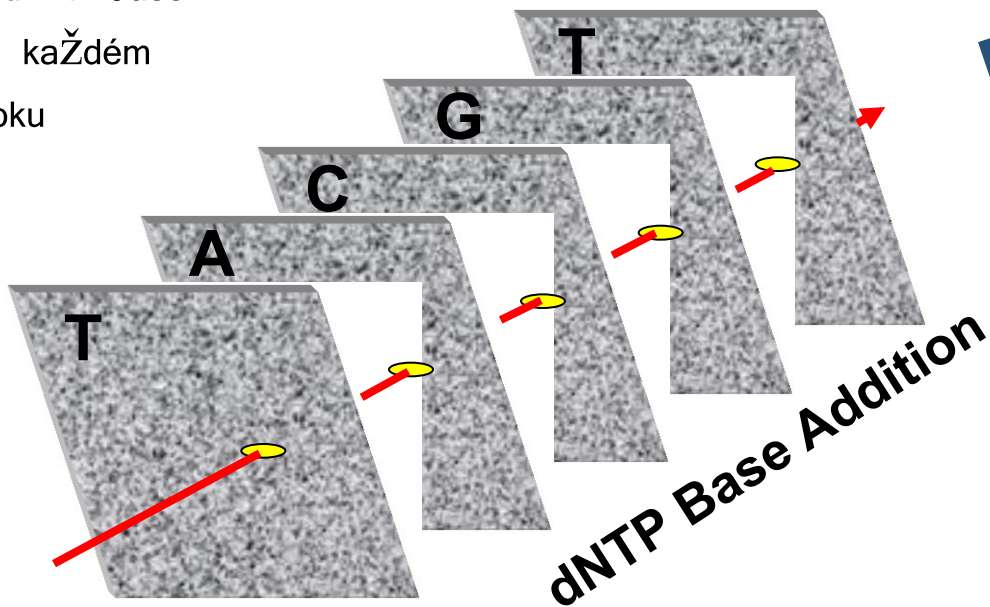
Nová generace sekvenování

- 300 000 jamek každá s jednou kuličkou obsahující jeden typ ssDNA
- jednokrokové PCR za přítomnosti pouze jednoho typu nukleotidu (pokud dojde k zainkorporování pak se emituje světlo, které je detegováno – intenzita přímo úměrná počtu nukleotidů)

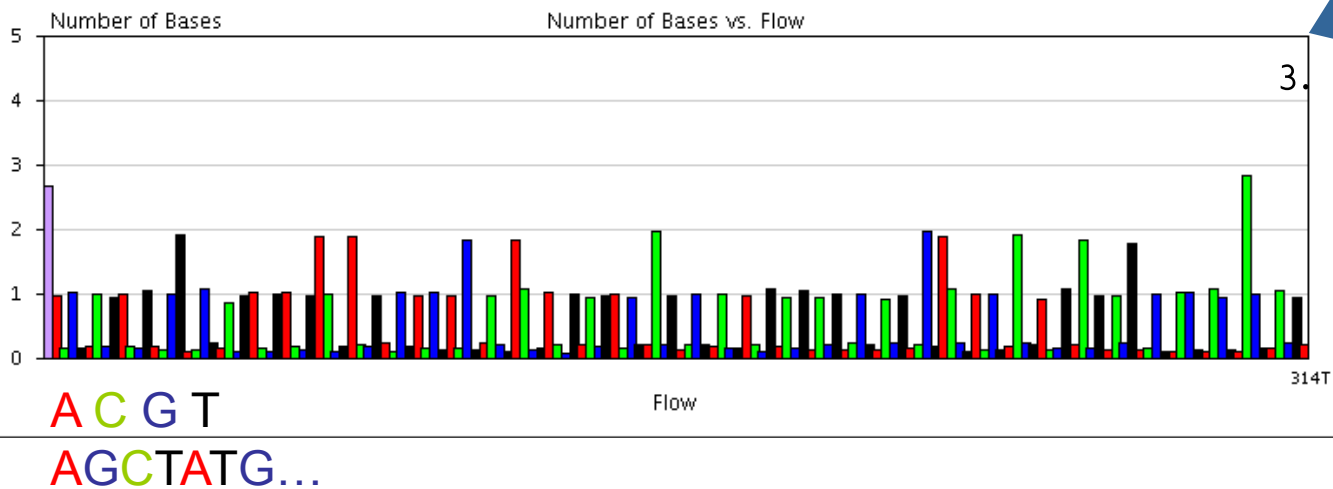


Technologie 454 od firmy Roche

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



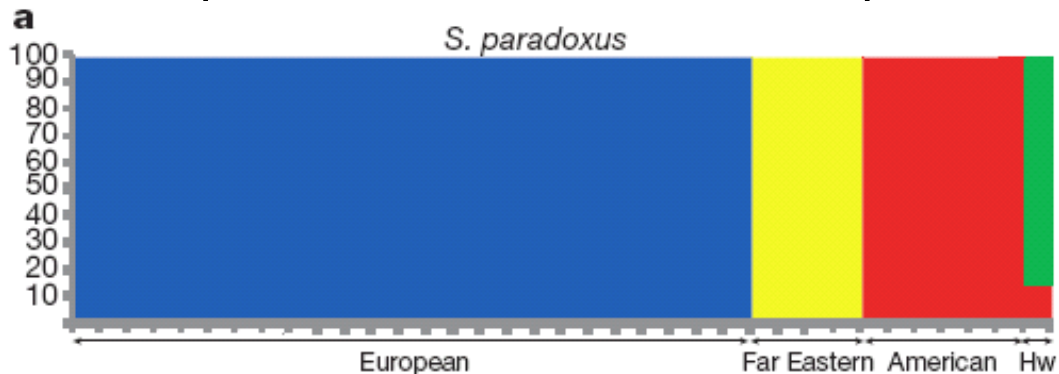
2. Snímek každé jamky se skládá do sekvence



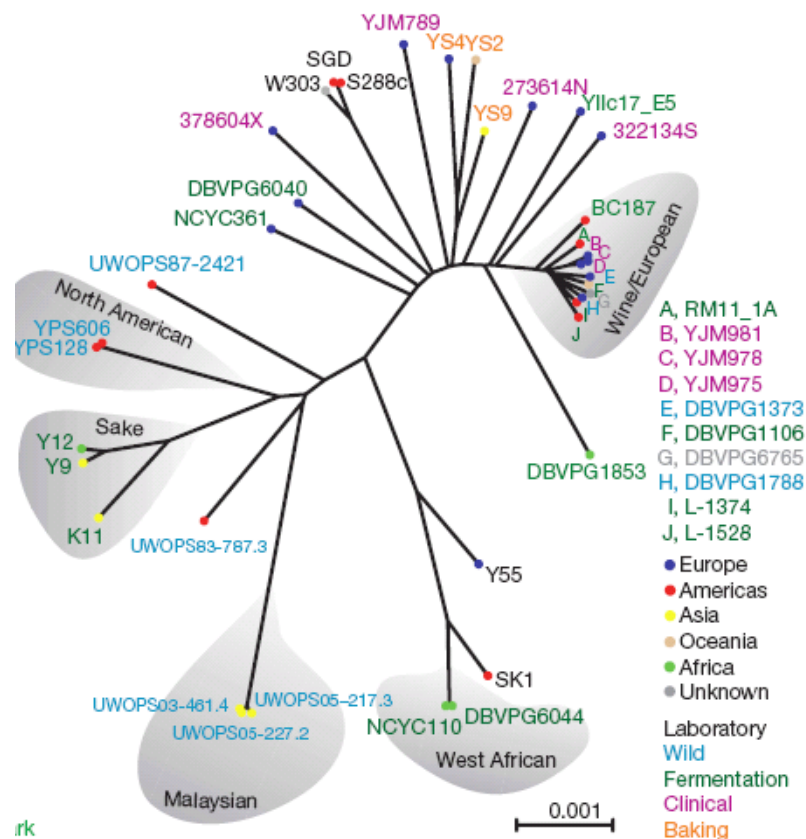
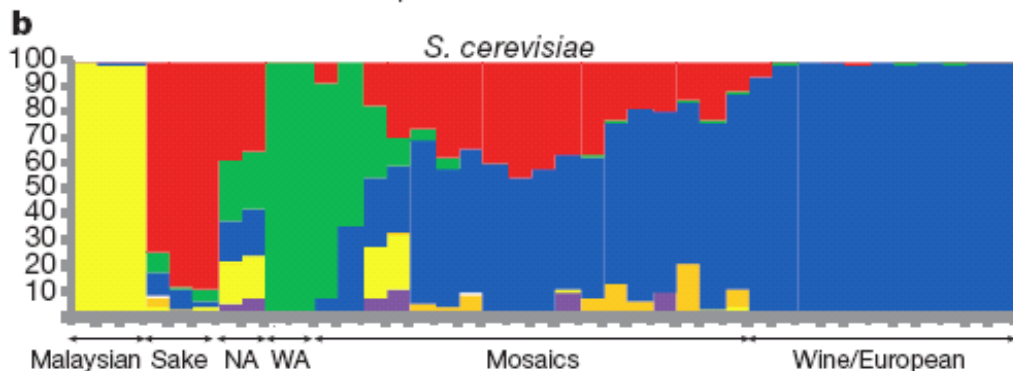
3. Síla signálu odpovídá počtu zainkorporovaných nukleotidů

Studie populací *S. cerevisiae* a *S. paradoxus*

- Sekvenace (+ hybridizace na čipech) > 100 kmenů z různých koutů světa
- *S. paradoxus* – linie izolované podle lokalit

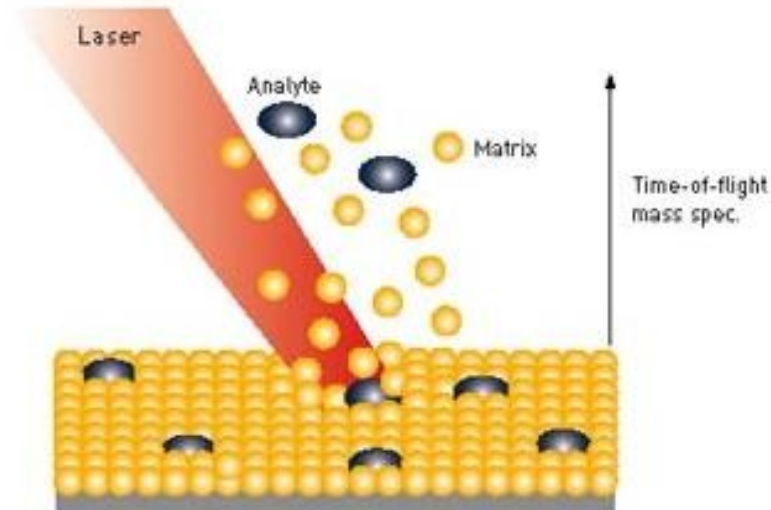


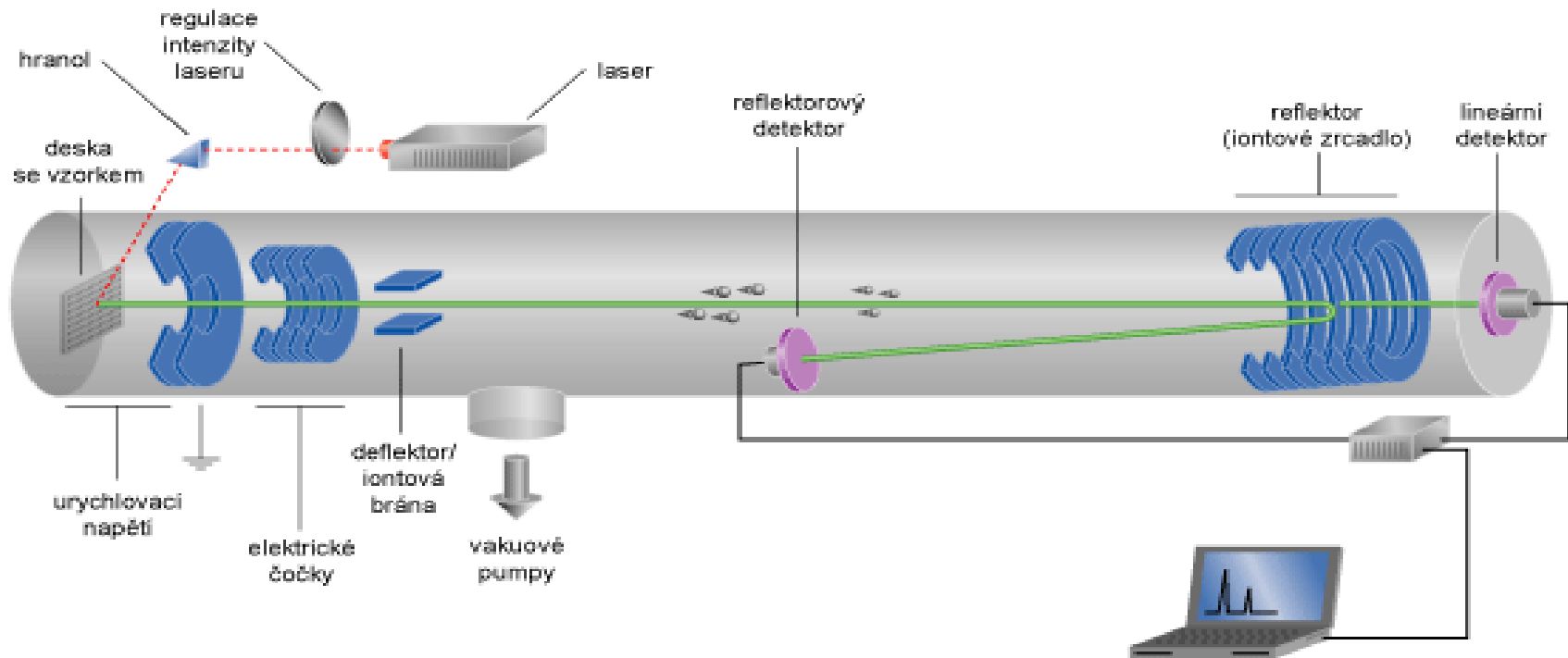
- *S. cerevisiae* - 3-4 původní linie, které se díky člověku křížily ...



MALDI-TOF

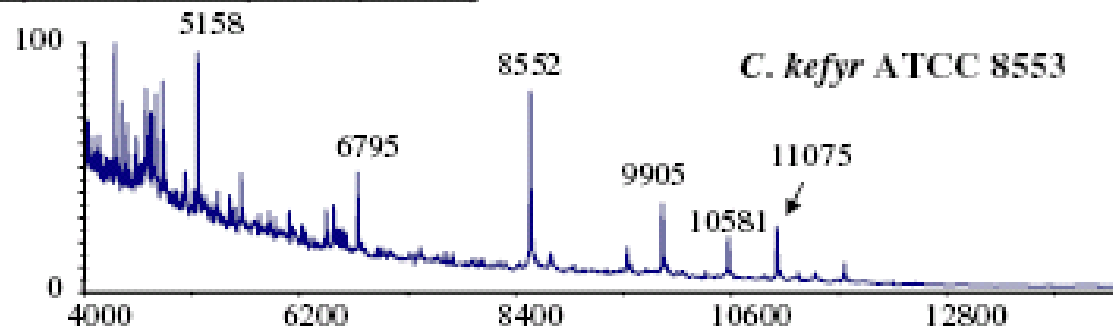
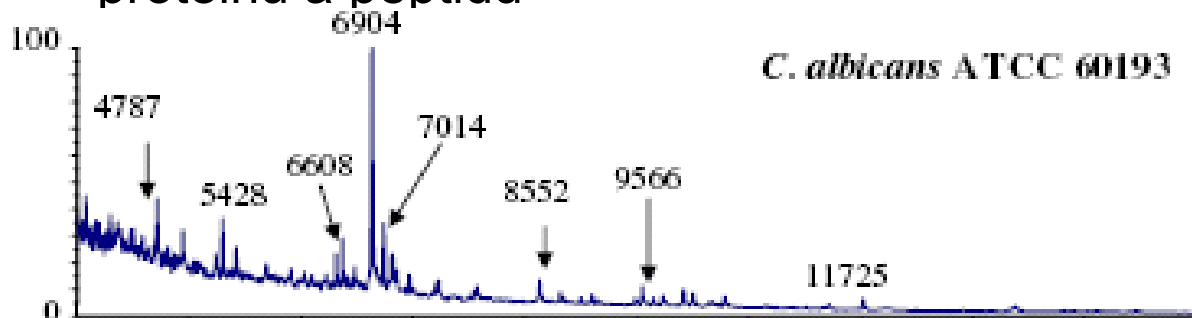
- hmotnostní spektrometrie s laserovou desorpcí a ionizací za účasti matrice s průletovým analyzátozem (matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry)
- Umožňuje odpaření a ionizaci netěkavých látek z pevné fáze přímo do plynné
- Vzorek je smíchán s tzv. matricí (v molárním 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



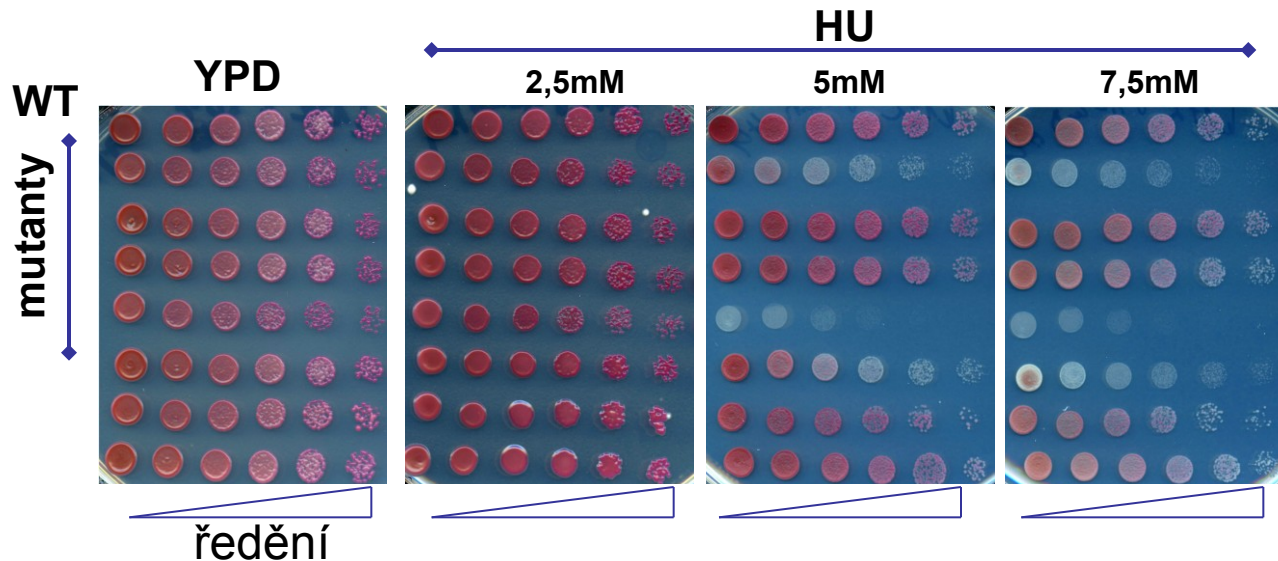
Práce s kvasinkami v laboratoři

- rychle se množí **EUKARYOTNÍ** buňky (90 min/dělení, 25-30°C)
- vytváří kolonie na „jednoduchých“ agarových plotnách (např. YPD)
- na plotně narostou za 2-3 dny a ve YPD médiu přes noc

YPD – bohaté médium = 10g/l yeast extract, 20g/l pepton, 20g/l dextrose (2% glukosa)

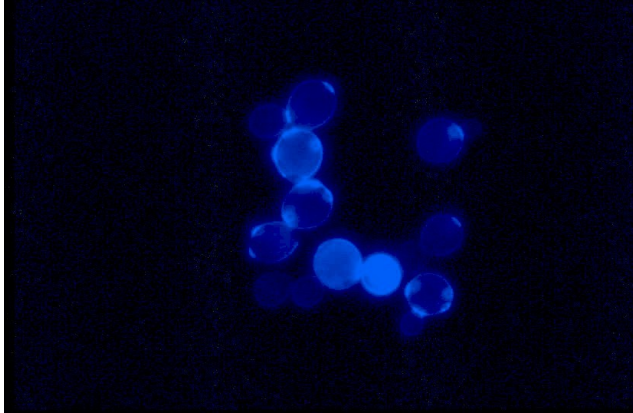
SD – minimální (syntetické) médium = 6.7g/l yeast nitrogen base w/o amino acids - aminokyseliny se přidávají dle selekce, 20g/l dextrose (2% glukosa)

- lze používat klasické mikrobiologické metody (roztírání, kapkování, otiskování ploten)
- do ploten je možné přidávat testovací látky (např. HU, MMS ...)



- na plotnách lze kvasinky uchovávat 1-3 měsíce (v lednici)
- pro dlouhodobé uchovávání se narostlé buňky (suspenze) smíchají s glycerolem (>15%), zamrazí se v dusíku a uloží na -80°C

- techniky barvení na fixovaných buňkách (cytoskelet, stěna ...) nebo
- *in vivo* pomocí GFP-značek



- mutagenézí lze připravovat teplotně senzitivní mutanty (ts, 37°C) a chladově senzitivní mutanty (cs, 20°C) – např. zastavení buněčného cyklu při 37°C
- lze připravovat buněčné extrakty pro analýzu DNA, proteinů ... (je třeba narušit silnou buněčnou stěnu pomocí enzymů nebo mechanicky)
- do buněk lze transformovat DNA (pomocí octanu litného a tepelného šoku nebo elektroporace)
- lineární DNA se integruje do genomu díky vysoké frekvenci homologní rekombinace (takto lze připravovat deleční a mutantní kmeny)
- plasmidová DNA se replikuje (centromerické a multicopy plasmidy – DNA knihovny)

- stabilní haploidní i diploidní formy (*S. cerevisiae*)
- haploidní buňky lze křížit na diploidní (heterozygotní mutanty)
- diploidní buňky lze sporulovat a využít pro genetickou analýzu (tetrádová analýza)

Saccharomyces cerevisiae

- (rostou) většinou v G1 fázi (zatímco pombe je v G2 fázi)
- Genom 12 Mbp na 16-ti chromosomech
- Krátké centromery a ARS (100bp)
- Kóduje přes 6 000 genů
- 120 kopií rRNA, 262 tRNA
- Geny reprezentují 75% celkové sekvence (kompaktní)
- <5% genů obsahuje introny (0.5% genomu), 3% transposony (46% u člověka)



- Výhody pro práci s *S.c.*

- 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)

Laboratorní S.c. kmeny

S288C – 1. osekvenovaný kmen

Genotype: *MAT α gal2 mal mel flo1 flo8-1 hap1*

Notes: Strain used in the systematic sequencing project, the sequence stored in SGD. S288C does not form pseudohyphae. In addition, since it has a mutated copy of [HAP1](#), it is not a good strain for mitochondrial studies. S288C strains are *gal2*- and they do not use galactose anaerobically.

References: [Mortimer and Johnston](#) (1986) Genetics 113:35-43.

Sources: [ATCC:204508](#)

W303 – nejčastěji používaný laboratorní kmen

Genotype: *MAT α /MAT α leu2-3,112 trp1-1 can1-100 ura3-1 ade2-1 his3-11,15*

Notes: W303 also contains a *bud4* mutation that causes haploids to bud with a mixture of axial and bipolar budding patterns. In addition, the original W303 strain contains the *rad5-535* allele.

References: W303 constructed by Rodney Rothstein (see [detailed notes](#) from RR).

Sources: [Biosystems:YSC1058](#)

Dvojhybridní systém:

Strain	Genotype	References
AH109	<i>MATα, trp1-901, leu2-3, 112, ura3-52, his3-200, gal4Δ, gal80Δ, LYS2 :: GAL1_{UAS}-GAL1_{TATA}-HIS3, GAL2_{UAS}-GAL2_{TATA}-ADE2, URA3 :: MEL1_{UAS}-MEL1_{TATA}-lacZ</i>	James <i>et al.</i> , 1996; A. Holtz, unpublished
Y187	<i>MATα, ura3-52, his3-200, ade2-101, trp1-901, leu2-3, 112, gal4Δ, met⁻, gal80Δ, URA3 :: GAL1_{UAS}-GAL1_{TATA}-lacZ</i>	Harper <i>et al.</i> , 1993
CG-1945	<i>MATα, ura3-52, his3-200, ade2-101, lys2-801, trp1-901, leu2-3, 112, gal4-542, gal80-538, cyh^r2, LYS2 :: GAL1_{UAS}-GAL1_{TATA}-HIS3, URA3 :: GAL4_{17-mers(x3)}-CYC1_{TATA}-lacZ</i>	Feilotter <i>et al.</i> , 1994; C. Giroux, pers. comm.

Chromosom III (S.c.)

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

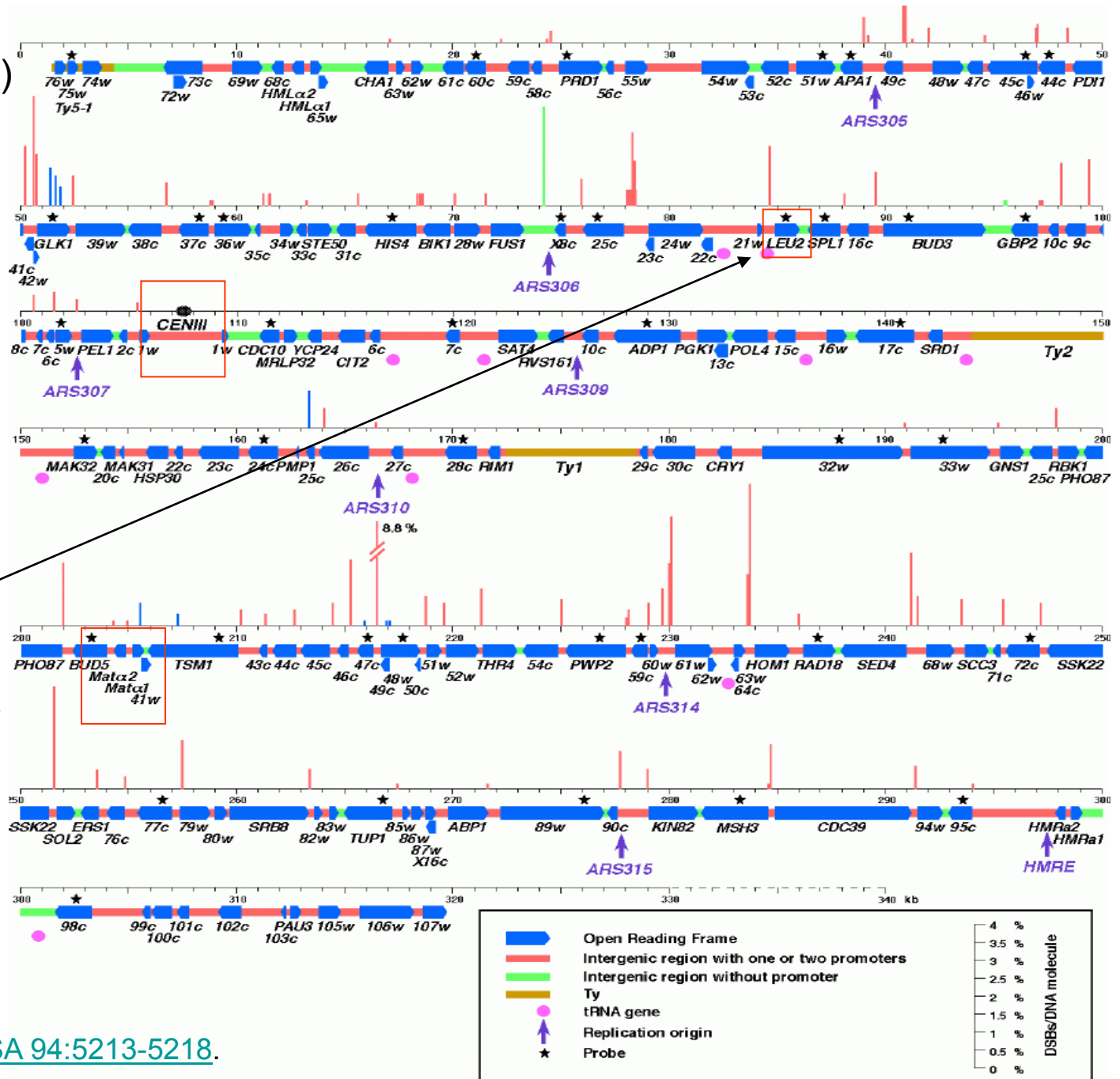
Leu2p - protein

leu2-Δ1 – delece

leu2-1 – mutace

LEU2::HIS3 – inzerce

HIS3 genu v lokusu *LEU2*



EUROSCARF YIL147c - Microsoft Internet Explorer

Soubor Úpravy Zobrazit Oblíbené Nástroje Nápověda

Zpět Hledat Oblíbené

Adresa <http://web.uni-frankfurt.de/fb15/mikro/euroscarf/data/YIL147c.html>

pdfforge explore with YAHOO! SEARCH PDFCreator eBay Amazon Options

Oblíbené

Přidat... Uspořádat...

- DIPBrowse
- DOMAC Protein Domain P...
- drawHCA
- EBI PISA - surfaces
- EBSCOhost Advanced Se...
- eF-seek
- embl
- EMBNet AUSTRIA
- EMBOSS analysis
- Ensembl release Homo sa...
- Entrez-PubMed
- Essential Uncharacterized...
- EST Profile - microarray
- EUROSCARF**
- ExpASy - ProtParam tool
- ExpASy - ScanProsite
- ExpASy - Tools
- ExpASy Molecular Biology...
- Fralalyzer
- FUGUE Profile Lib Search
- GCG-instructions
- GCUA seqoverall optimal
- gene
- GeneCards
- Genesilico
- Genesilico Metaserver - m...
- GENEVESTIGATOR - shap...
- Gestation, Incubation, an...



**EUROPEAN
SACCHAROMYCES
CEREVISIAE
ARCHIVE FOR
FUNCTIONAL ANALYSIS**

EUROSCARF
[complete deletion strain](#)
[set available now](#)

- [Home](#)
- [Description](#)
- [Address](#)
- [Collection index](#)
 - [Chr I](#)
 - [Chr II](#)
 - [Chr III](#)
 - [Chr IV](#)
 - [Chr V](#)
 - [Chr VI](#)
 - [Chr VII](#)
 - [Chr VIII](#)
 - [Chr IX](#)
 - [Chr X](#)
 - [Chr XI](#)
 - [Chr XII](#)
 - [Chr XIII](#)

YIL147c list of available strains and plasmids

acc. no.	strain name	genotype
Y22306		BY4743; Mat a/α; his3Δ1/his3Δ1; leu2Δ0/leu2Δ0; lys2Δ0/LYS2; MET15/met15Δ0: ura3Δ0/ura3Δ0; YIL147c::kanMX4/YIL147c

Gene name: SLN1 YPD2 CSR4 NRP2

YIL147c at [MIPS](#), [SGD](#), and [YPD](#)

03-Apr-2001
[Matthias Rose](#)

Internet

Start 5 Microsoft ... 3 Internet E... Doručená poš... CorelDRAW X... 2 Microsoft ... 53BP1 nuclear... 3 Microsoft ... EndNote X1 - ... CS 13:38

Allele	Reverts?	Notes	Molecular description ^a	Reference
<u>ade2-101</u>	yes	ochre mutation, red colonies	G to T transversion at nucleotide 190, changing amino acid 64 from a Glu to a Stop	<u>Gai and Voytas, 2005</u>
<u>can1-100</u>	yes	ochre mutation	AAA-to-TAA ochre nonsense change at codon 47	Rodney Rothstein, <u>Personal communication to SGD.</u>
<u>his3delta200</u>	no	Cold sensitive; high frequency of petite formation, especially during transformation. Note that this deletion damages the <u>PET56</u> promoter. See <u>Zhang et al., (2003)</u> for a discussion of this issue.	1 kb deletion, (-205 to 835)	<u>Struhl 1985; Fasullo and Davis 1988; Siram et al. YGM RNA processing mtg 1993</u>
<u>leu2-3,112</u>	no	double mutant	GTC-to-GTT silent change at codon 56, GTT-to-GCT missense change at codon 69, G insertion at nucleotide 249, G insertion at nucleotide 792, GTT-to-GTC silent change at codon 299, GAC-to-AAC missense change at codon 300.	<u>Hinnen et al. 1978;</u> <u>Gaber and Culbertson 1982;</u> <u>Meira LB et al., 1995;</u> Rodney Rothstein, <u>Personal communication to SGD.</u>
<u>trp1-1</u>	yes	amber mutation	GAG-to-TAG amber nonsense change at codon 83	<u>McDonald, et al. 1997</u>
<u>ura3-52</u>	no	-	Ty1 insertion (transcribing left to right) at pos. 121	<u>Rose and Winston 1984</u>

Auxotrofie



marker	aktivita	auxotrofie	pozn.
<i>ADE2</i>	fosforibosylamino-imidazole-karboxylasa	Ade-	vyžaduje adenin k růstu, červené kolonie (metabolit)
<i>HIS3</i>	Imidazoleglycerol-fosfat dehydratasa	His-	vyžaduje histidin k růstu, inhibitor 3-aminotriazol (3-AT)
<i>LEU2</i>		Leu-	vyžaduje leucin k růstu
<i>LYS2</i>	α -aminoadipate reduktasa	Lys-	vyžaduje lysin k růstu, inhibitor α-aminoadipic acid (aAA)
<i>TRP1</i>		Trp-	vyžaduje tryptofan k růstu
<i>URA3</i>	orotidine-5' fosfat dekarboxylasa	Ura-	vyžaduje uracil k růstu, * 5-fluoro-orotic acid (FOA)

*FOA je přeměňován Ura3p dekarboxylázou na toxický 5-fluorouracil. *URA3+* buňky nerostou, zatímco *ura3-* buňky jsou resistantní (další způsob selekce – zpětná)

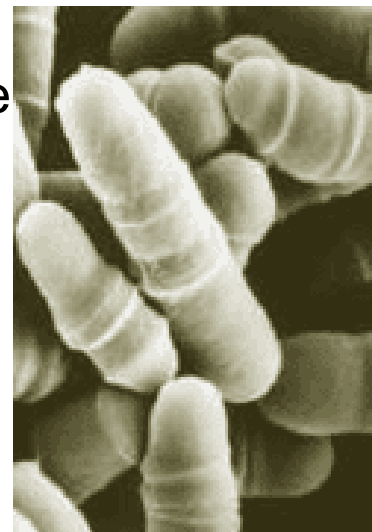
G418 (kanMX) – obdoba anti-bakteriálního antibiotika kanamycinu, hygromycin (hyg), clonnat/noursethecín (nat) - lze použít i na *S.pombe* a *P.pastoris*

Pichia pastoris

- podobné geny jako *S. cerevisiae* (stejná nomenklatura, schopnost komplementace)
- genom na 4 chromosomech
- metylotrófní kvasinka (schopná růst na metanolu jako jediném zdroji uhlíku)
- Metanol je odbouráván v 1.kroku alkohol oxidázou (AOX1)
- P_{AOX1} je silný promotor (5% celkové RNA) – represe glukózou a indukce metanolem
- exprese proteinů je 10-100x vyšší (až 30% celkového proteinu)
- vytváří kratší glyko řetězce (8-14 manosových zbytků – podobné vyšším eukarytům; *S.c.* 50-150 manosových zbytků - více imunogenní)

Schizosaccharomyces pombe

- 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



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

Laboratorní kmen

Pichia pastoris

GS1115 – expresní kmen

Genotype: *his4*

Notes: Invitrogen kit

Laboratorní kmen

Schizosaccharomyces pombe

501 – nejčastěji používaný laboratorní kmen

Genotype: *h- leu1-32, ura4-Δ18 ade6-704*

Notes: *LEU2* gen z *S.c.* komplementuje *leu1-32* mutaci, *URA3* gen z *S.c.* slabě komplementuje *ura4* delecii, kolonie *ade6-704* mutant jsou červené (jako *ade2* *S.c.* mutanty)