

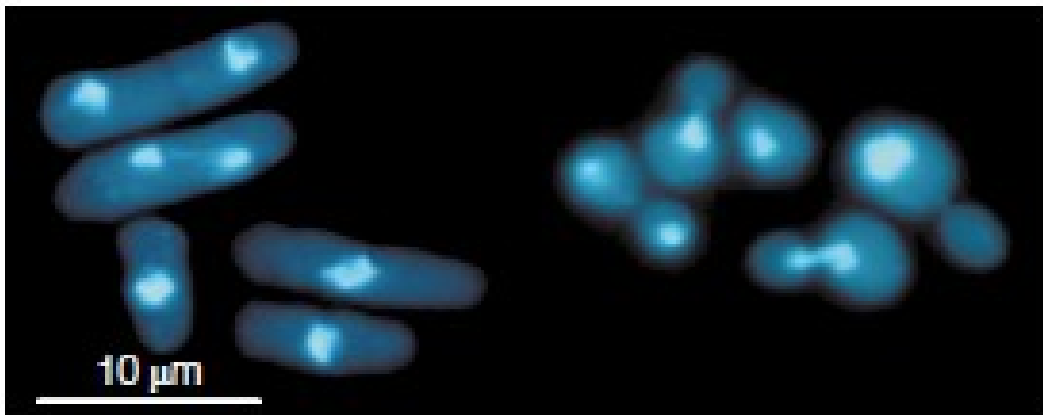
Souhrn 3. přednášky

(Mgr. Jana Kopecká)

- Biotechnologie (pivo, vino)
- Analytické metody

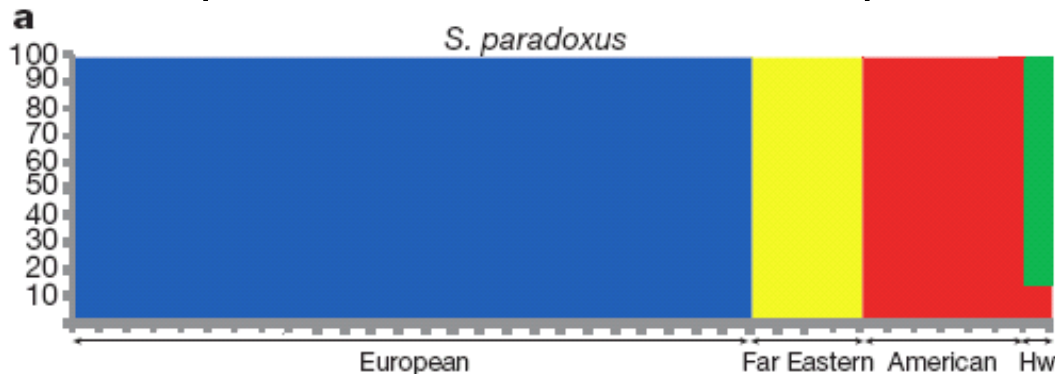
Osnova 4. přednášky

- Analytické/diagnostické metody
- Genetické metody
 - Plasmidy
 - Integrace
 - Tetrádová analýza
 - Syntetická letalita, suprese

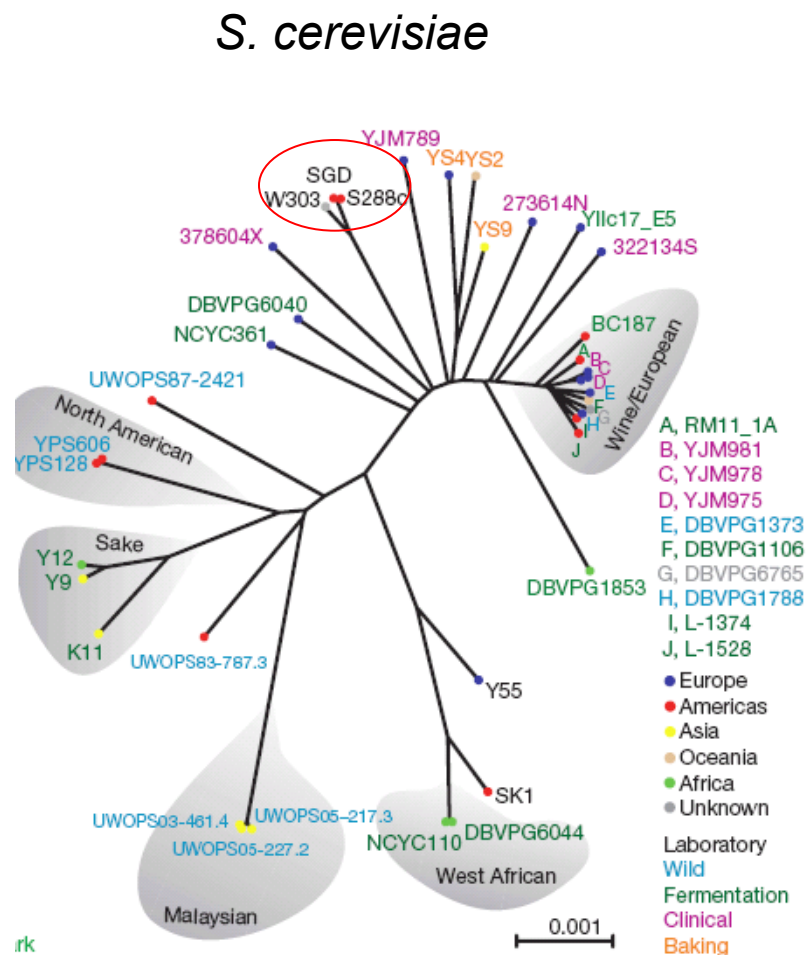
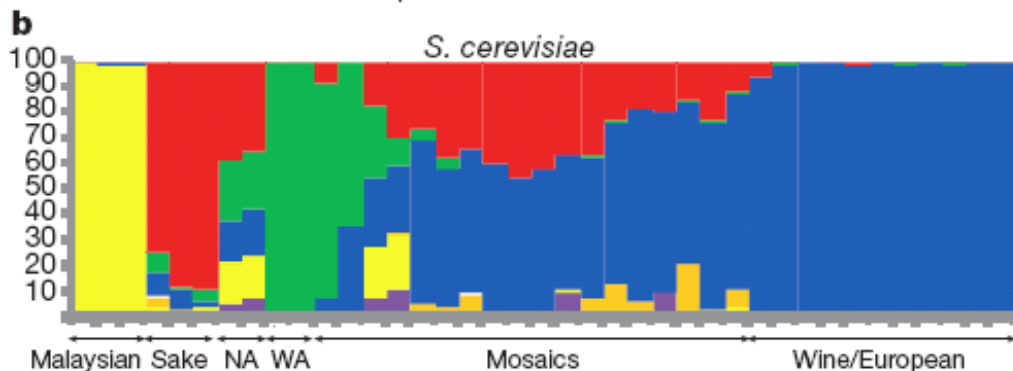


Studie populací *S. cerevisiae* a *S. paradoxus*

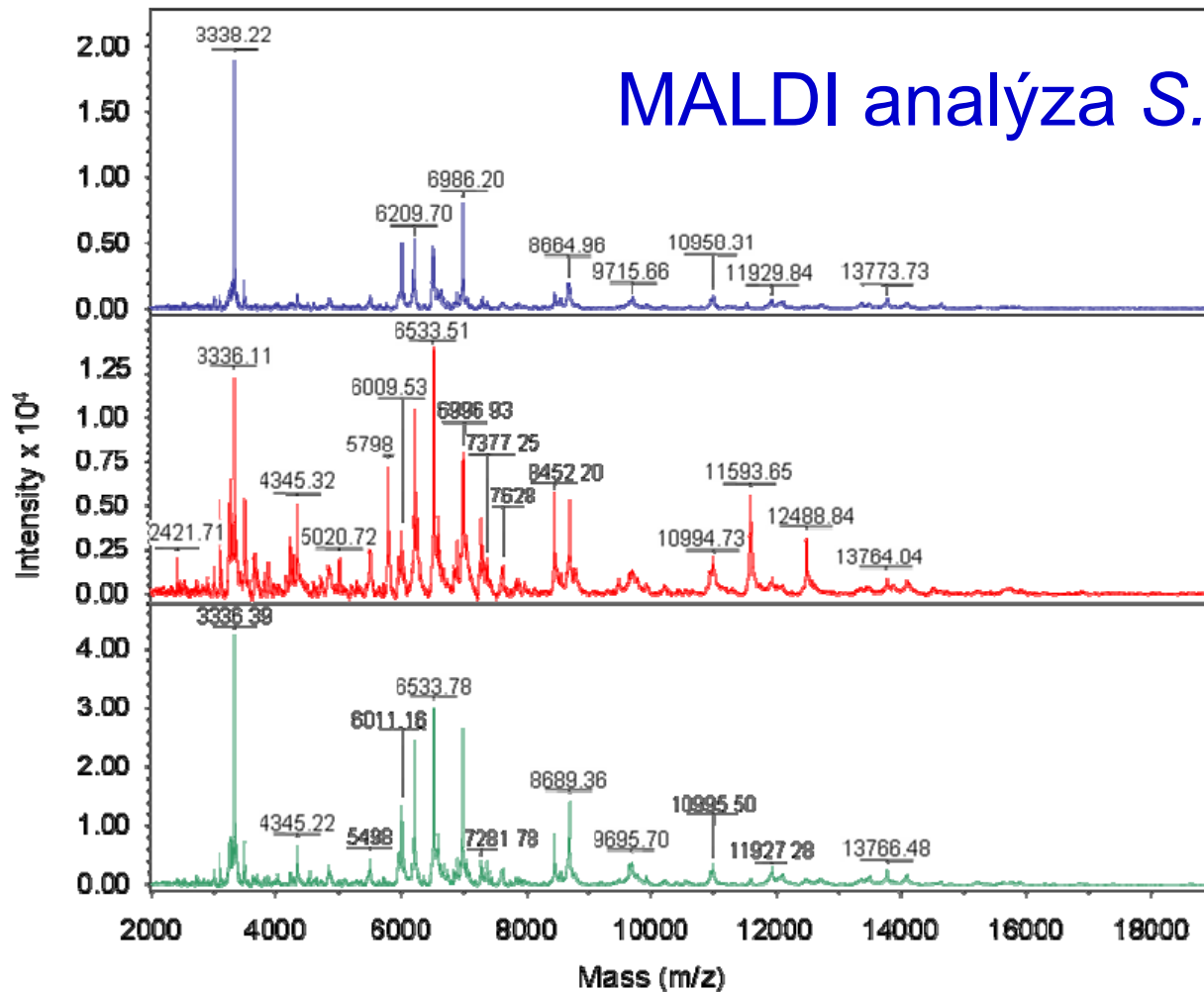
- Sekvenace (+ hybridizace na čipech) > 100 kmenů z různých koutů světa
- *S. paradoxus* – linie izolované podle lokalit



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



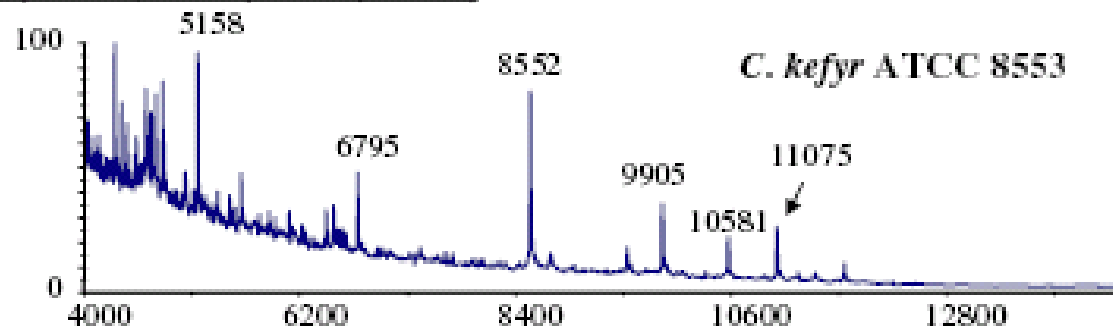
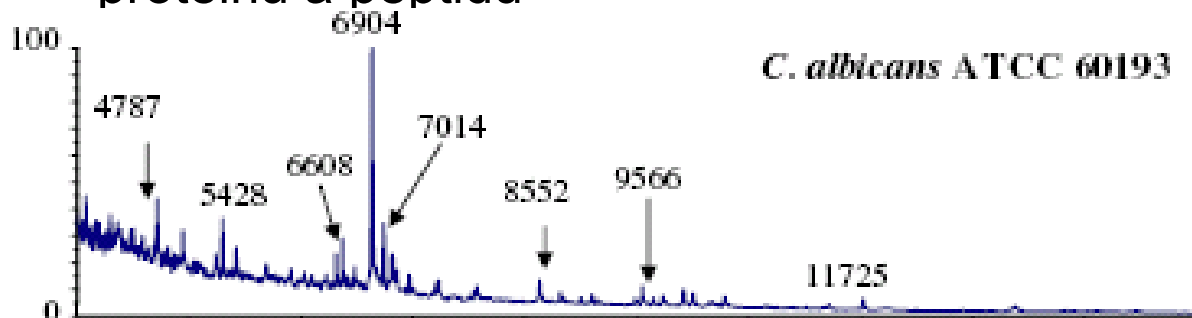
MALDI analýza *S. cerevisiae* kmenů



Rozdíly spekter jsou způsobeny :

- odlišnostmi v sekvencích proteinů (viz evoluční vzdálenost)
- odlišnostmi v metabolismu (přítomnost různých enzymů)
- MALDI použito i na odlišení piva (zbytkových proteinů)

- 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



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

V klinické praxi je důležitější rychlost než přesnost (při zachování správné léčby)

- fenotypové metody

morfologie kolonií nebo 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



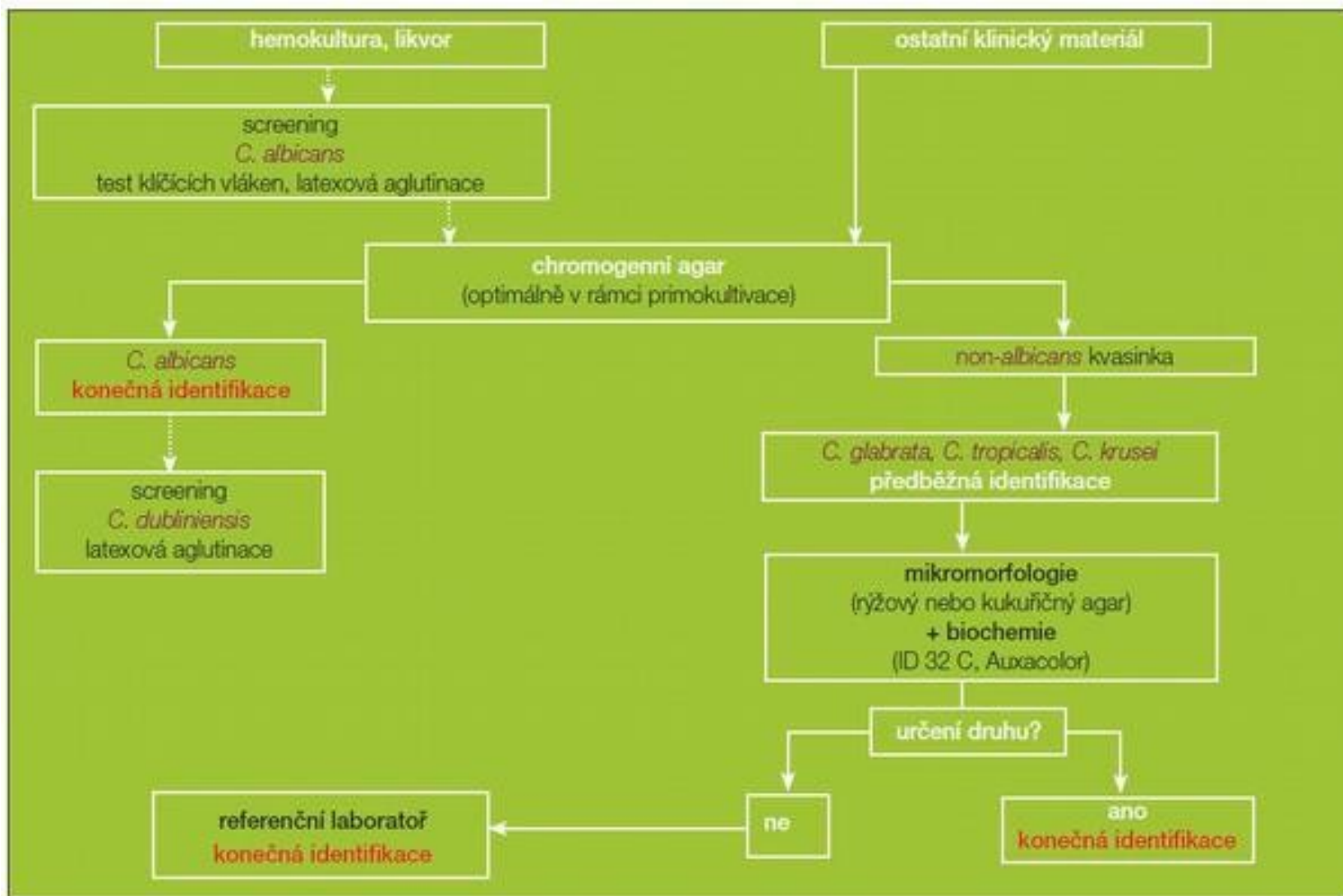
Tab. 1 – Nejčastěji používané metody pro identifikaci kvasinek

Charakter identifikace	Princip	Způsob detekce	Hodnocení
orientační	selektivní a diagnostické půdy	aktivita enzymů, produkce pigmentu	fluorescence, barevná změna
	mikromorfologie	nativní preparát	klíční hyfy
	sérologie	monoklonální protilátky	aglutinace
	enzymatické testy	aktivita enzymů	barevná změna
podrobná	mikromorfologie	nativní preparát	chlamydospory artospory mycellum/pseudomycellum
		barvený preparát	askospory pouzdra
	biochemie	asimilace	intenzita zákalu barevná změna
		fermentace	produkce CO ₂
	molekulární biologie	analýza DNA	FISH (fluorescence) PCR
		analýza RNA analýza proteinů	NASBA MALDI-TOF MS

FISH – fluorescenční hybridizace *in situ*, PCR – polymerázová řetězová reakce, NASBA – amplifikace založená na sekvencích nukleové kyseliny, MALDI-TOF MS – hmotnostní spektrometrie „Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization – Time of Flight“

(Hamal a spol. 2010: Postgraduální medicína)

<http://zdravi.e15.cz/clanek/postgraduální-medicína-priloha/identifikace-kvasinek-z-klinického-materialu-prehled-soucasnych-moznosti-se-zamerenim-na-fenotypove-metody-a-komerční-produkty-455847>





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

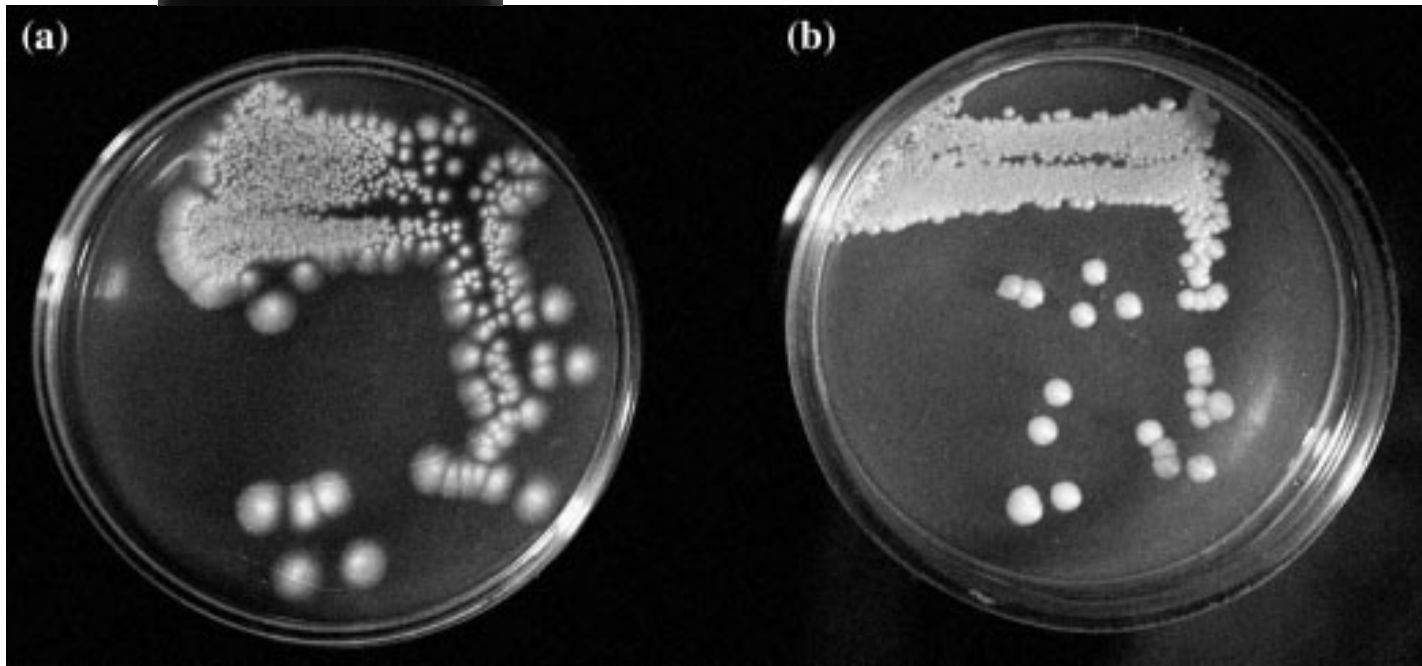
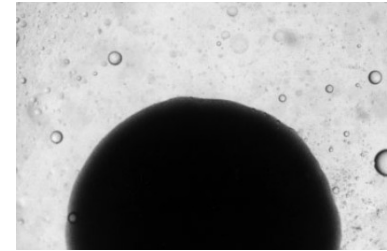
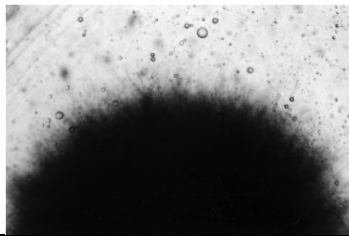
Campanha et al., 2005, Oral Diseases

C. albicans: na delších hyfách či pseudohyfách jen jedna terminální chlamyospora



C. dubliniensis: nadbytek chlamyospor na koncích krátkých pseudohyf

Mikromorfologie - Kolonie



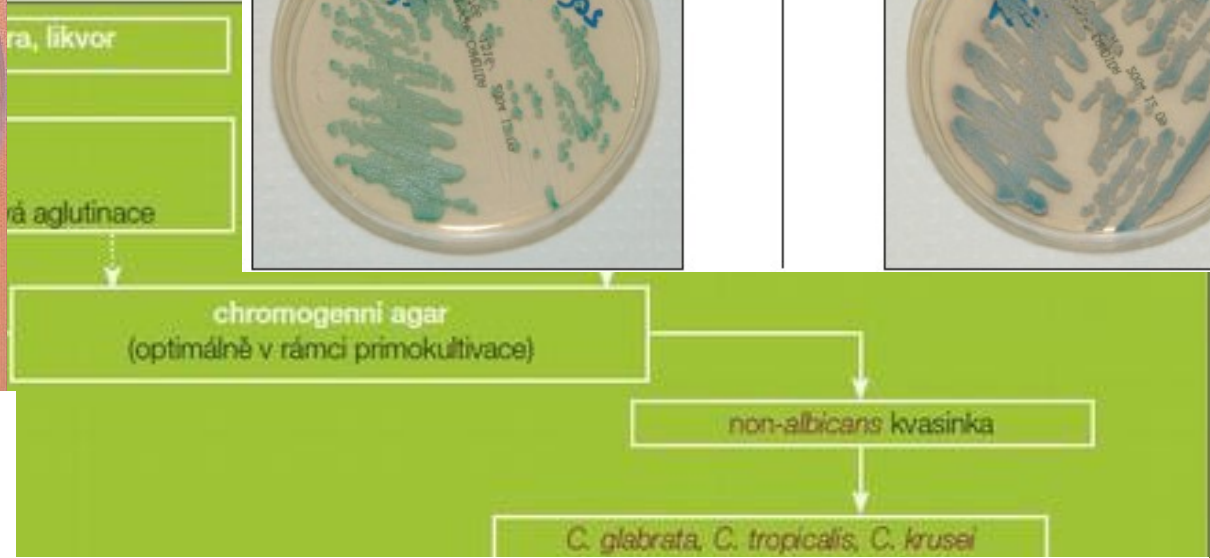
Např. odlišení *C.d.* od *C.a.*: 24h kultivace na Staibově agaru při teplotě 37 C
(a) *C. dubliniensis* (b) *C. albicans*



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

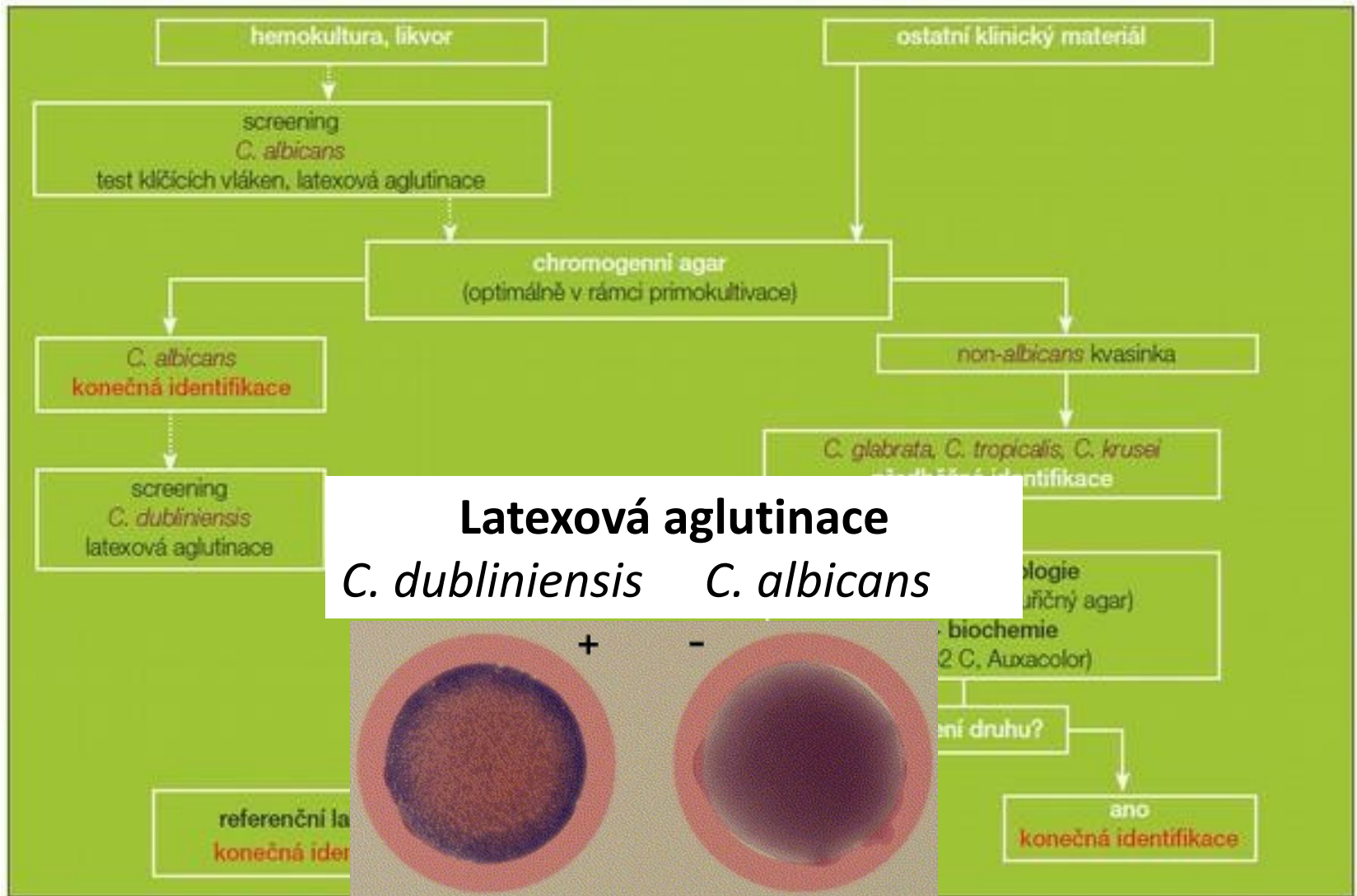


ATCC 13803 (*C. tropicalis*) at 48 h.



***C. albicans*/*C. tropicalis*
C. crusei/*C. glabrata***

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

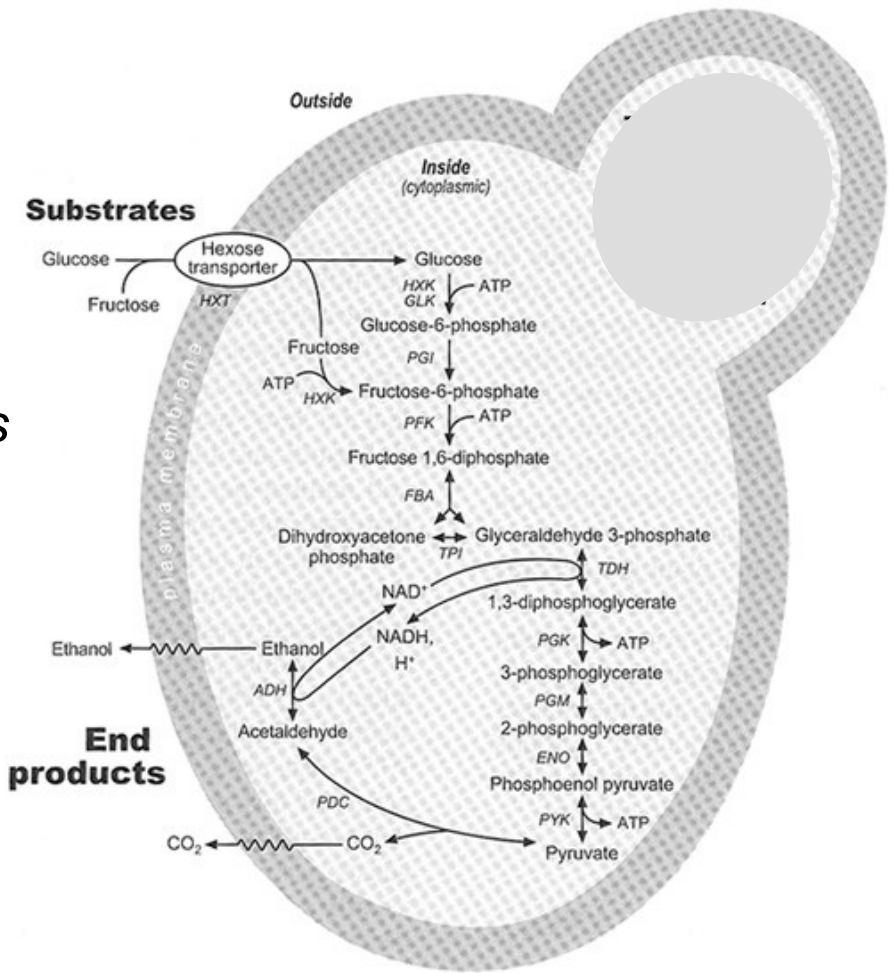


Fenotyp – fyziologie

- Teplotní stabilita
- Asimilace
- Fermentace cukrů
- Utilizace dusíku
- Hydrolýza močoviny

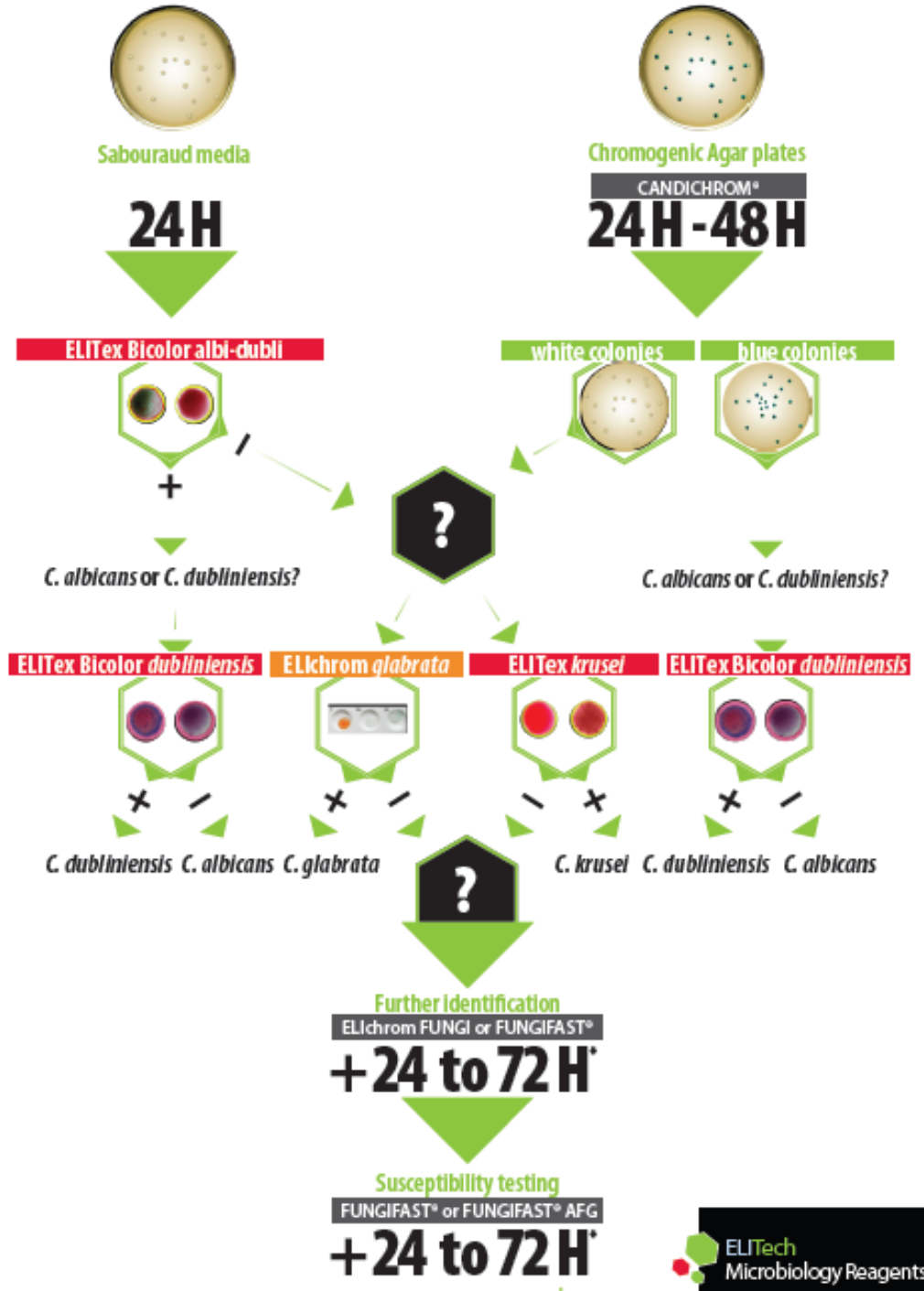
(např. *C. dubliniensis* není schopna využít D-xylózu, D-trehalózu, methyl- α -D-glukosid – chybí β -D-glukosidázová aktivita; *C. albicans* není schopna využít glycerol)

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



Jsou k dispozici komerční soupravy pokrývající určité kvasinkové druhy

- Fumouze Diagnostics
- ELItech
- M-tech diagnostics
- Bio-Merieux



Laboratorní kvasinkové kmeny

S. pombe – „501“

Genotype: *h- ura4-D18 leu1-32 ade6-704*

S. Cerevisiae – „S288C“ – 1. osekvenovaný kmen

Genotype: *MAT α SUC2 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

Sources: [Biosystems:YSC1058](#)

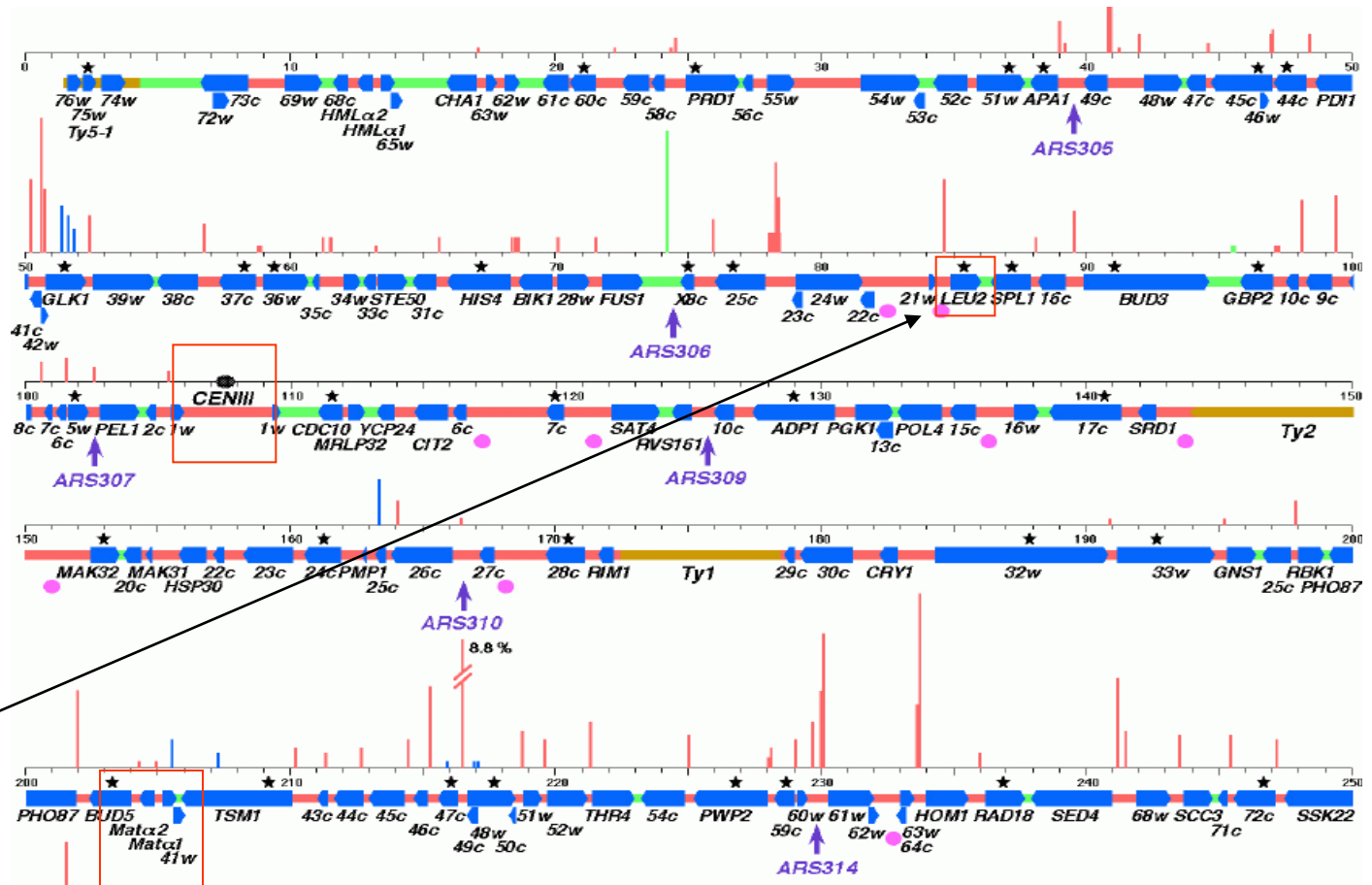
Dvojhybridní
systém:

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, cyh2, 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
(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
(identifikační číslo alely)
LEU2::HIS3 – inzerce
HIS3 genu v lokusu
LEU2



Strain	Genotype	References
AH109	<i>MATα</i> , <i>trp1-901</i> , <i>leu2-3</i> , 112, <i>ura3-52</i> , <i>his3-200</i> , <i>gal4Δ</i> , <i>gal80Δ</i> , <i>LYS2::GAL1_{UAS}-GAL1_{TATA}-HIS3</i> , <i>GAL2_{UAS}-GAL2_{TATA}-ADE2</i> , <i>URA3::MEL1_{UAS}-MEL1_{TATA}-lacZ</i>	James <i>et al.</i> , 1996; A. Holtz, unpublished
Y187	<i>MATα</i> , <i>ura3-52</i> , <i>his3-200</i> , <i>ade2-101</i> , <i>trp1-901</i> , <i>leu2-3</i> , 112, <i>gal4Δ</i> , <i>met</i> , <i>gal80Δ</i> , <i>URA3::GAL1_{UAS}-GAL1_{TATA}-lacZ</i>	Harper <i>et al.</i> , 1993
CG-1945	<i>MATα</i> , <i>ura3-52</i> , <i>his3-200</i> , <i>ade2-101</i> , <i>lys2-801</i> , <i>trp1-901</i> , <i>leu2-3</i> , 112, <i>gal4-542</i> , <i>gal80-538</i> , <i>cyh2</i> , <i>LYS2::GAL1_{UAS}-GAL1_{TATA}-HIS3</i> , <i>URA3::GAL4_{17-mers(x3)}-CYC1_{TATA}-lacZ</i>	Feilotter <i>et al.</i> , 1994; C. Giroux, pers. comm.

Auxotrofie - selekce

Allele	Reverts?	Notes	Molecular description ^a	Reference
ade2-101	yes	ochre mutation, red colonies	G to T transversion at nucleotide 190, changing amino acid 64 from a Glu to a STOP	Gai and Voytas, 2005
his3-200	no	Cold sensitive; high frequency of petite formation, especially during transformation.	1 kb deletion , (-205 to 835)	Struhl 1985 ; Fasullo and Davis 1988
leu2-3,112	no	double mutant	GTT-to-GCT missense change at codon 69, G insertion at nucleotide 249, G insertion at nucleotide 792, GAC-to-AAC missense change at codon 300.	Hinnen et al. 1978 ; Gaber and Culbertson 1982 ;
trp1-1	yes	amber mutation	GAG-to-TAG amber (STOP) nonsense change at codon 83	McDonald, et al. 1997
ura3-52	no	-	Ty1 insertion	Rose and Winston 1984

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 et al., 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 et al., 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 et al., 1994; C. Giroux, pers. comm.

Shuttle vektory

- vychází z 2 μ m plasmidů nebo centromer (*S.c.*; 2 μ m přítomné také v *Zygosaccharomyces bailii*, *Z. rouxii* a *Kluyveromyces drosophilorum*)
- Kvasinková část – marker (URA3 ... kanMX), CEN-ARS (1 kopie) nebo 2 μ m (~50 kopií na haploidní buňku) začátek replikace
- Bakteriální část – Kan resistance, replikace
- Promotor, tag, MCS
 - Kondicionální mutanty (fenotyp-funkce)
 - Nadprodukce (suprese mutací nebo toxicita)

Promoter	Regulation/ Relative Protein Expression Level	Signal Strength on Western blot ^b
<i>ADH1</i> (full-length)	Ethanol-repressed/High	+++
<i>ADH1</i> (410 bp+) ^c	Constitutive/medium	++
<i>ADH1</i> (410 bp)	Constitutive/low	+/- (weak)
	Constitutive/ very low	(not detectable)
<i>ADH1</i> (700 bp)	Constitutive/high	+++
<i>GAL1</i> (full-length)	Repressed by glucose; induced (high-level) by galactose	(not detectable) ^d +++ ^d
<i>MET1</i>	Methionin repressed	
<i>CUP1</i>	Indukovaný mědí	
<i>MFA1</i>	MATa specifický (haploid specifický)	

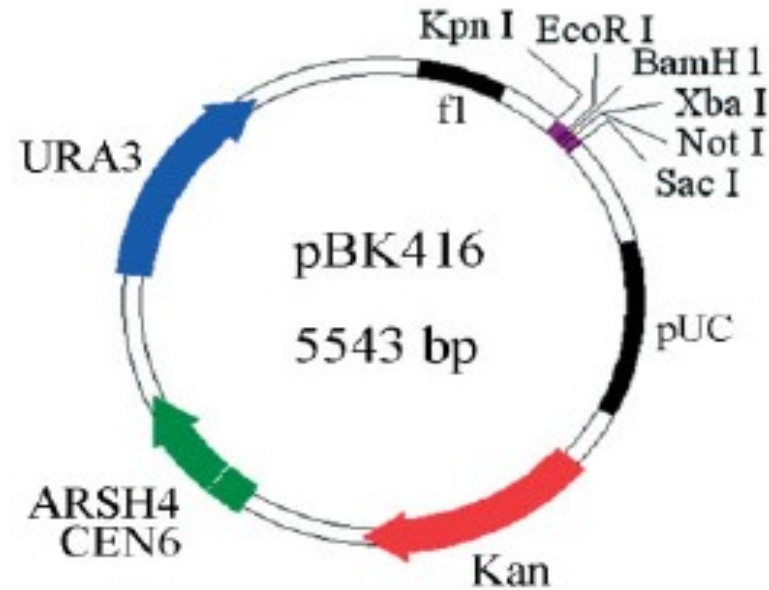


Table 1 | **Nomenclature in the two yeast species**

	<i>S. cerevisiae</i>	<i>S. pombe</i>
Wild-type gene	<i>YFG1</i>	<i>yfg1</i> ⁺
Deletion (null) mutant	<i>Δyfg1 yfg1Δ</i>	<i>Δyfg1 yfg1Δ</i>
Recessive mutant	<i>yfg1-1</i>	<i>yfg1-1</i>
Dominant mutant	<i>YFG1-2</i>	<i>yfg1-2</i>
Protein	Yfg1 YFG1p	Yfg1 yfg1p

Yfg typically means 'your favourite gene'. The 'p' designation for proteins (for example, Yfg1p) is occasionally used. *S. cerevisiae*, *Saccharomyces cerevisiae* or budding yeast; *S. pombe*, *Schizosaccharomyces pombe* or fission yeast.

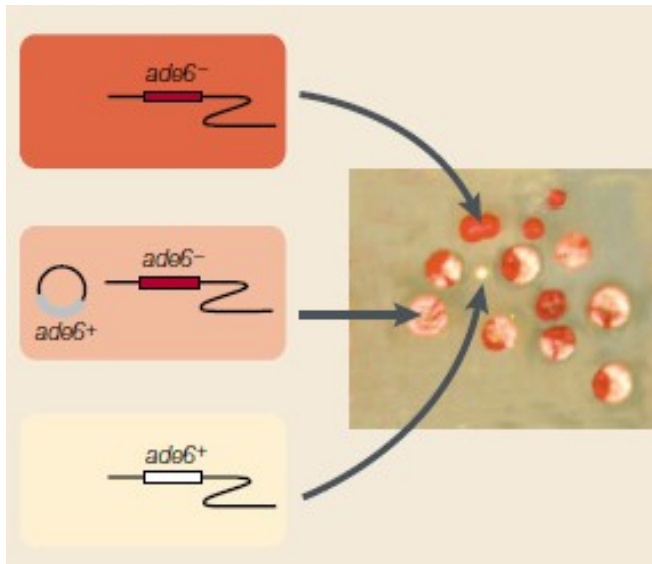
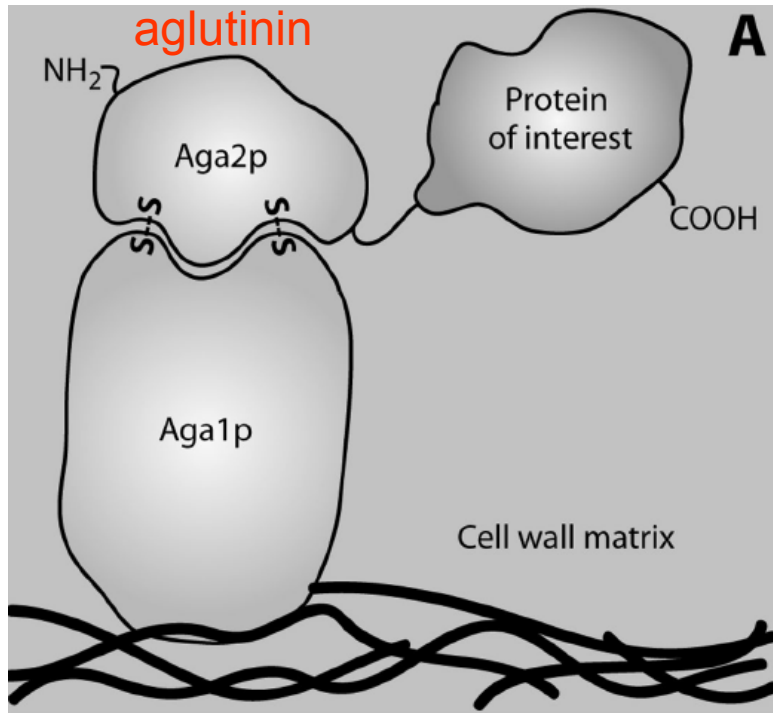
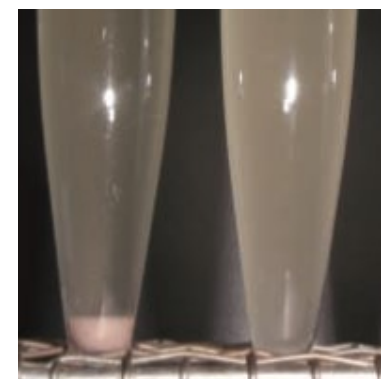


Table 2 | **Corresponding tools in the two yeast species**

	<i>S. cerevisiae</i>	<i>S. pombe</i>
Regulated promoter	<i>GAL</i> (galactose regulated)	<i>nmt</i> (thiamine regulated)
Plasmid replication origins	<i>ARS1</i> or 2μ	<i>ars1</i>
Auxotrophic markers		
Uracil, orotidine 5'-phosphate decarboxylase Select against with 5-FOA	<i>URA3</i>	<i>ura4</i> ⁺
Leucine, β-isopropylmalate dehydrogenase	<i>LEU2</i>	<i>leu1</i> ⁺
Adenine, phosphoribosyl-aminoimidazole carboxylase Accumulates red colour	<i>ADE2</i>	<i>ade6</i> ⁺

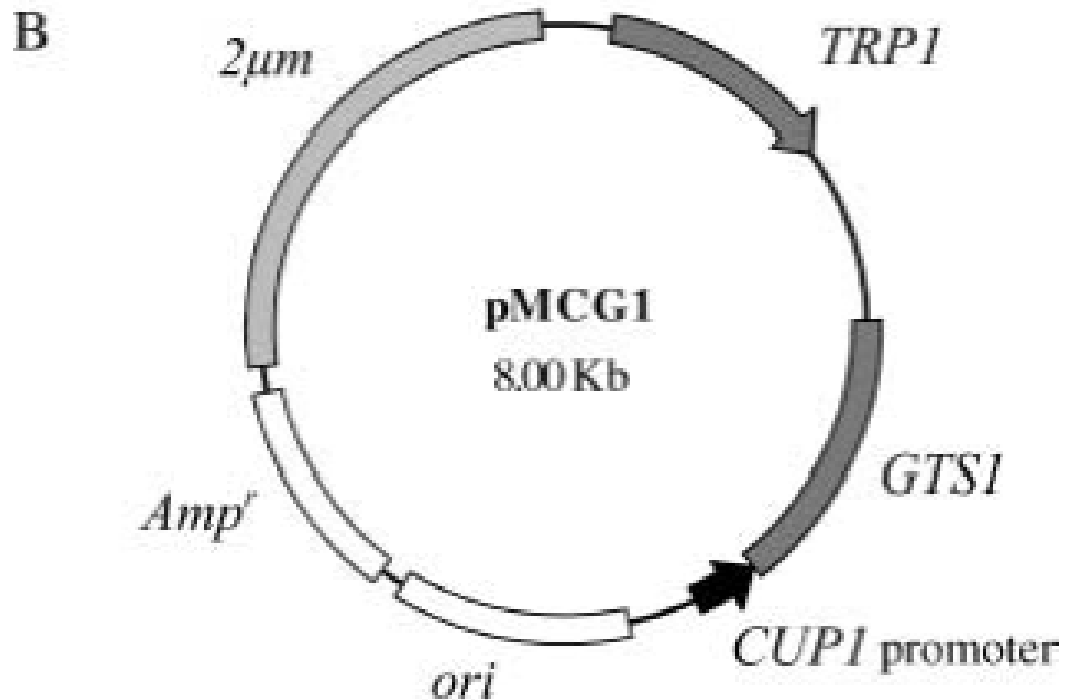
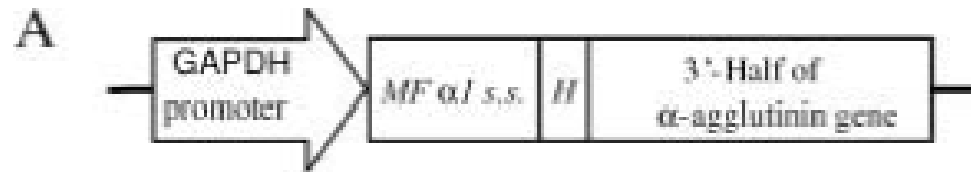
2μ (2 micron), an endogenous plasmid DNA molecule found in some yeast cells, with a circumference of 2μ; 5-FOA, 5'-fluoro-orotic acid. *S. cerevisiae*, *Saccharomyces cerevisiae* or budding yeast; *S. pombe*, *Schizosaccharomyces pombe* or fission yeast.

Yeast surface display



- His-His-His-His-His-His
(chelatuje Ni, Cu, Co kovy)

pRS406-Ura3 plasmid



- hybrid Aga2 (aglutininy nebo Flo1... proteinem

- exprese eukaryotních proteinů v kvac mechanismy ... posttranslační modifi

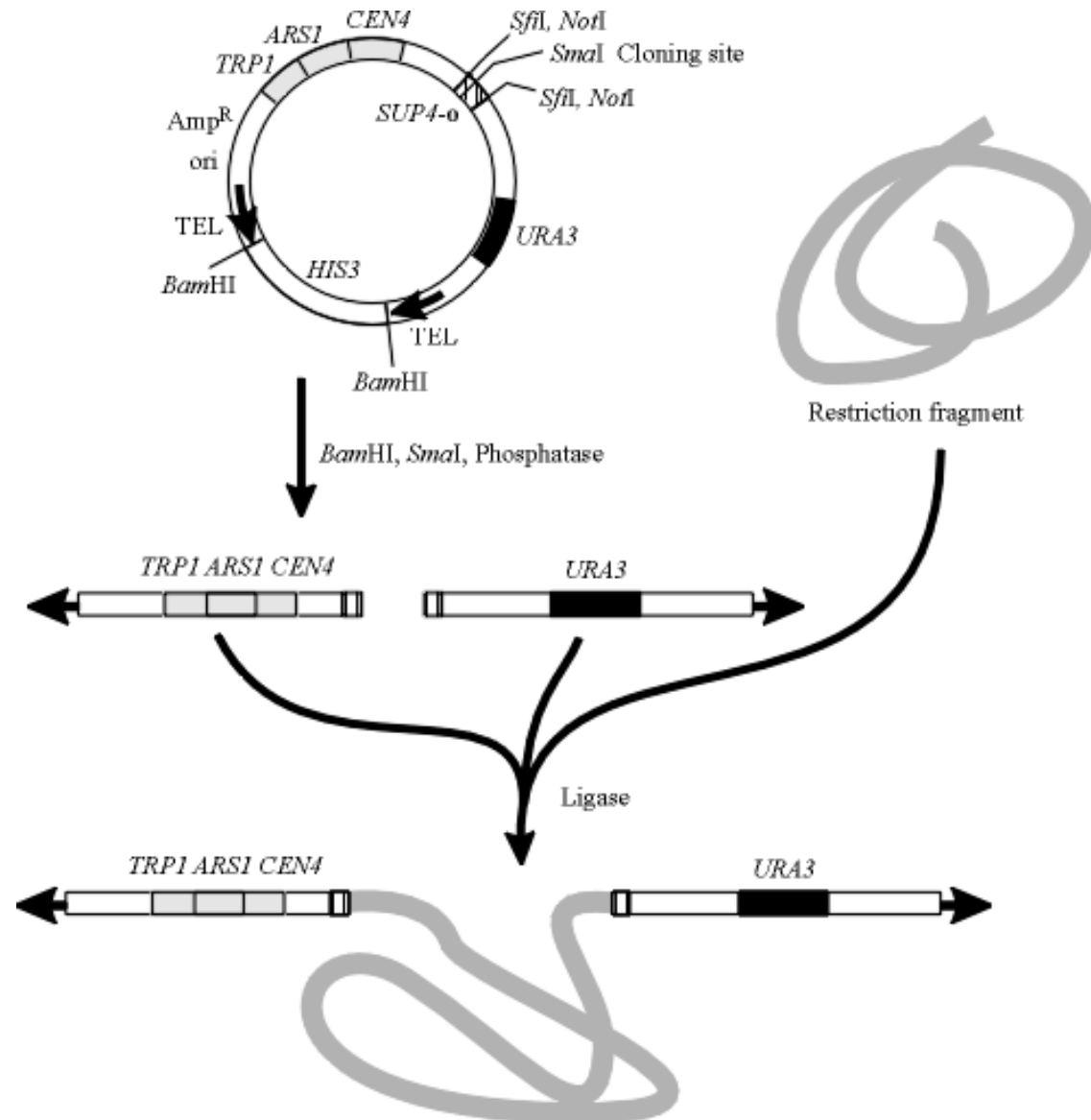
lidských cDNA (i protilátek z pacientů - využití i pro biotechnologie – vychyt (dekontaminace)

Kuroda et al, Ap

Pepper et al, CCHTS (2008)

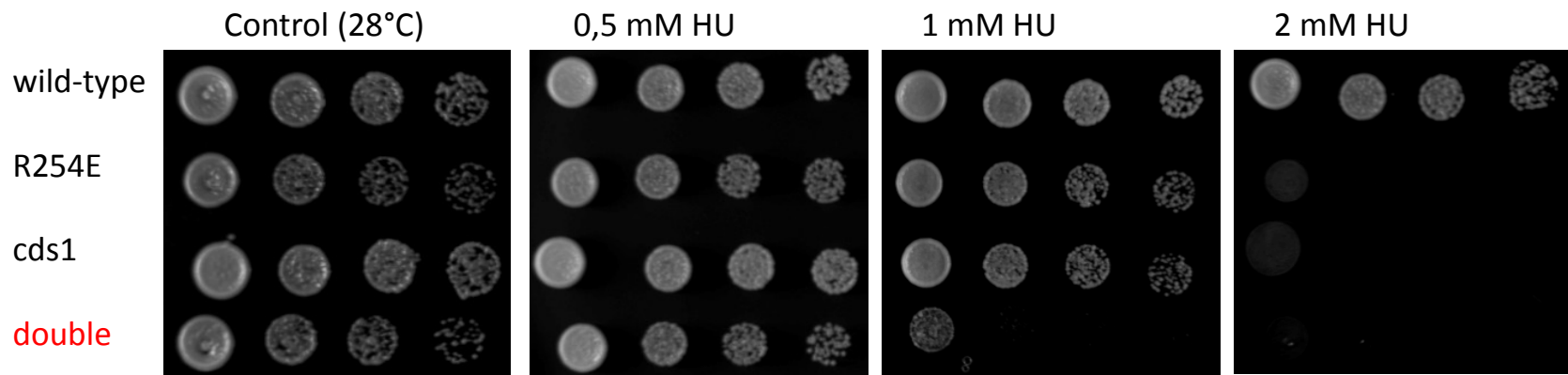
YAC (yeast artificial chromosome)

- Bakteriální část – Amp resistance, počátek replikace
- Kvasinková část – marker, CEN-ARS, TEL
- 50-500kbp insert např. lidská genová banka pro HuGO 80000 klonů YAC (270kbp)
- Klonování, množení, uchování dlouhých fragmentů DNA
- Výzkum savčích telomer a centromer
- Pomocí transfekce, lipofekce nebo elektroporace lze dostat YAC i do savčích buněk – náhodně se integrují do genomu - výzkum nesestřihnutých genů (dlouhé regulační úseky)

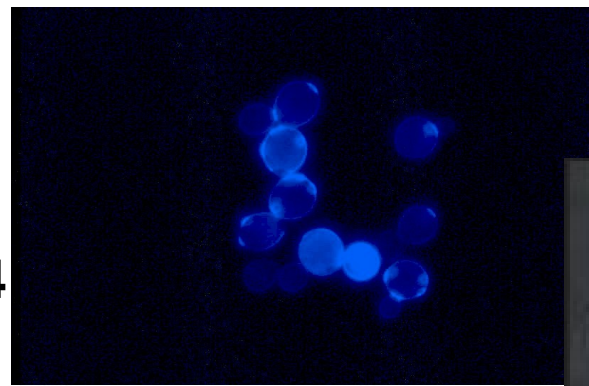


Proč kvasinky pro výzkum?

- Rychle se množí 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 DNA)
- 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**
 - DNA/jádro – **DAPI**
 - aktinový – **phalloidin**
 - buněčná stěna – **calcofluor**
 - Endocytóza ->vakuoly – **FM4-64**
 - Mitochondrie, ER - **DiOC₆**

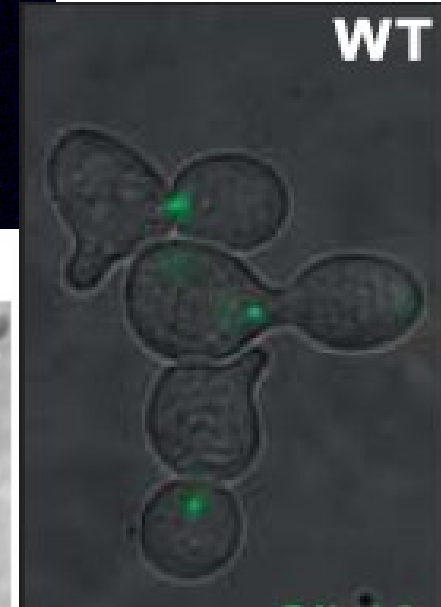
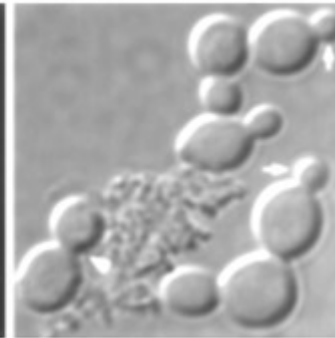
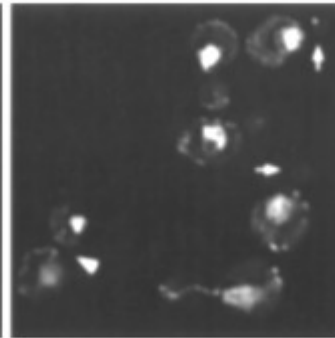
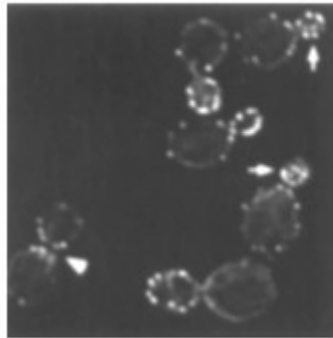


(3,3'-dihexyloxa

rhodamine-phalloidin
(F-actin)

DAPI
(nucleic acids)

DIC
(contrast image)



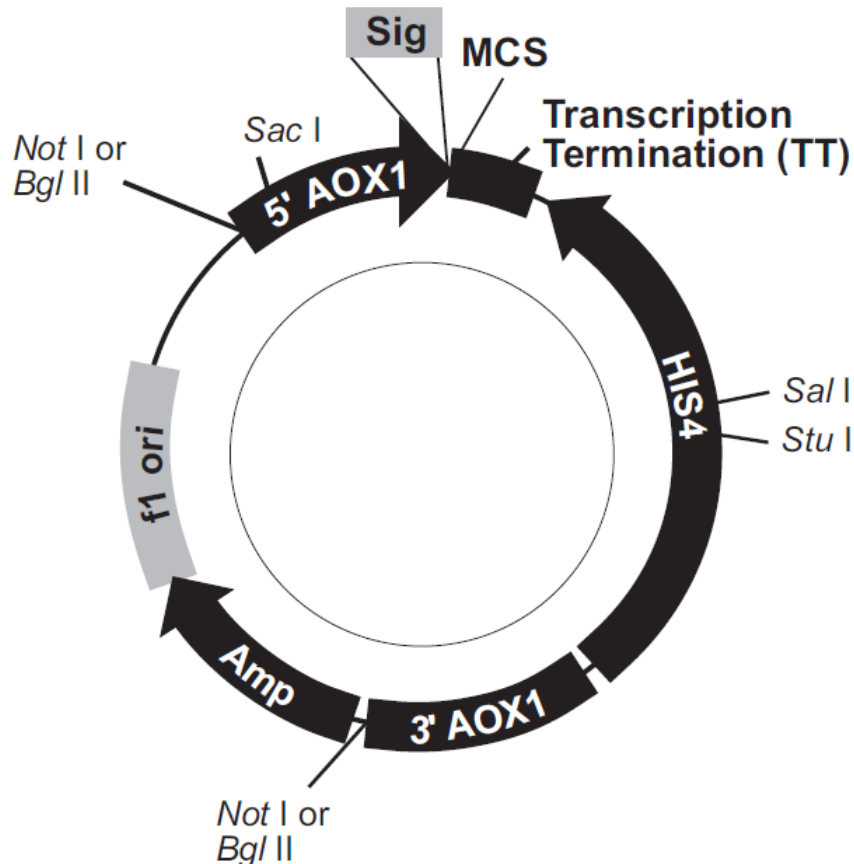
– proteiny tago

- **Techniky syn**

- **S.c.** má kompaktní genom – knihovny s genomovou DNA (není třeba cDNA)
- Kompletně osekvenovaný genom (genomové aplikace)
- EuroFan projekt – delece všech S.c. genů (+GFP, +2-hybrid)
- Mikročipy - expresní profily za různých podmínek
- Řada buněčných dějů/mechanismů má analogii v procesech v savčích buňkách (lidské geny testovány v kvasinkách - nemoci, metabolismus, regulační mechanismy) – **příprava mutant**

Integrativní plasmidy

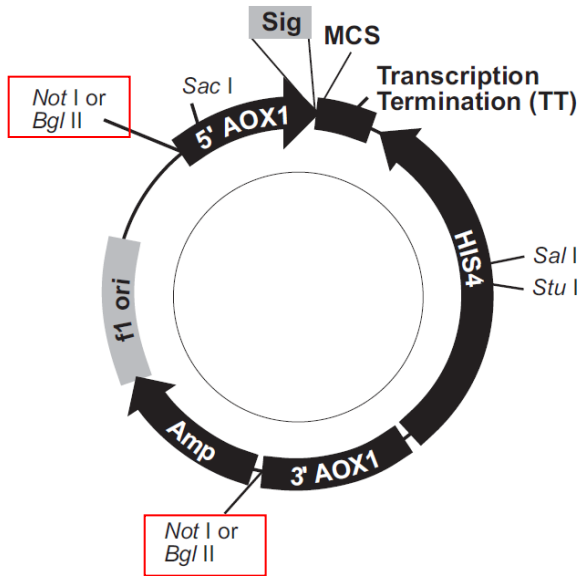
- nemají CEN ani 2 μ m části



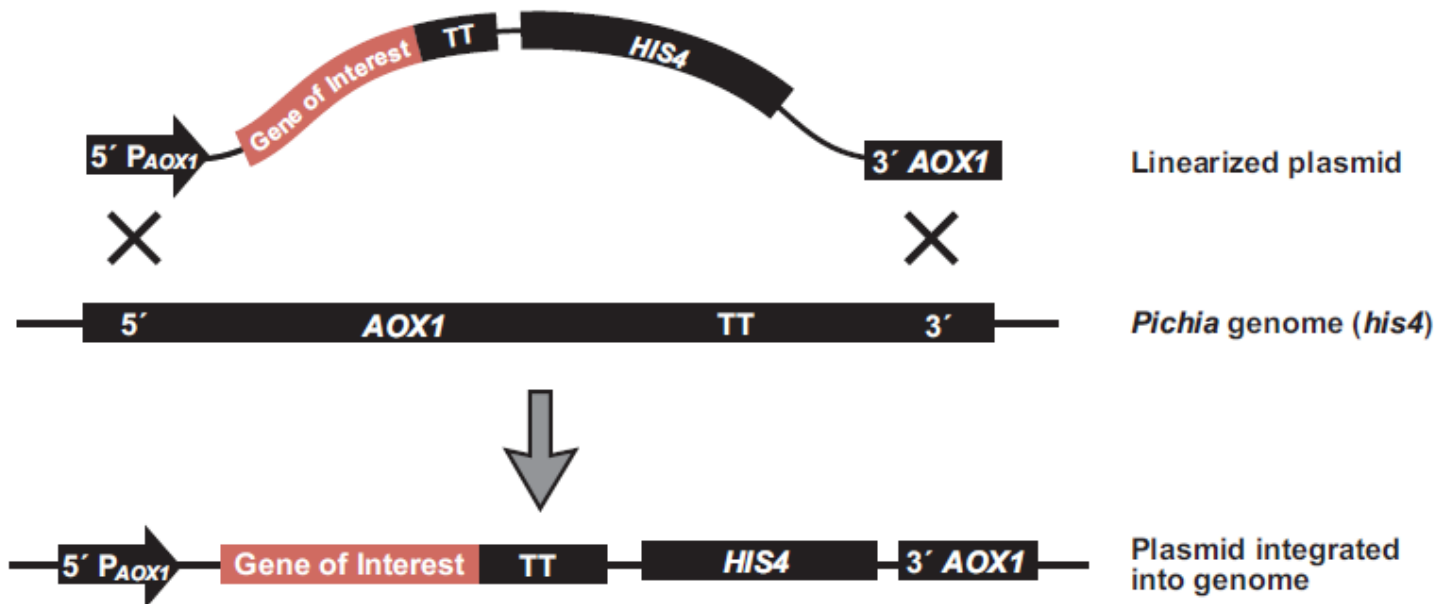
- integrativní plasmid pro *P.pastoris* (GS1115, genotype: *his4*)
 - exprese z AOX1 promotoru v *P.pastoris*

Feature	Description	Benefit
5' AOX1	An ~1000 bp fragment containing the <u>AOX1 promoter</u>	Allows <u>methanol-inducible high level expression</u> in <i>Pichia</i> Targets plasmid integration to the AOX1 locus.
Sig	DNA sequence coding for an N-terminal <u>protein secretion</u> signal	Targets desired protein for secretion
MCS	<u>Multiple Cloning Site</u>	Allows insertion of your gene into the expression vector
TT	Native <u>transcription termination</u> and polyadenylation signal from AOX1 gene (~260 bp)	Permits efficient <u>transcription termination and polyadenylation</u> of the mRNA
HIS4	<i>Pichia</i> wild-type gene coding for histidinol dehydrogenase (~2.4 kb) and used to complement <i>Pichia his4</i> strains	Provides a <u>selectable marker</u> to isolate <i>Pichia</i> recombinant strains
3' AOX1	Sequences from the AOX1 gene that are further 3' to the TT sequences (~650 bp)	Targets plasmid integration at the AOX1 gene
Amp pBR322 origin	<u>Ampicillin resistance</u> gene <i>E. coli</i> origin of replication	Allows selection, replication, and maintenance in <i>E. coli</i>
f1 origin	Bacteriophage f1 origin of replication (458 bp)	Permits generation of single-stranded DNA for mutagenesis
<i>Not I</i> <i>Bgl II</i> <i>Sac I</i> <i>Sal I</i> <i>Stu I</i>	Unique restriction sites	Permits <u>linearization of vector</u> for efficient integration into the <i>Pichia</i> genome

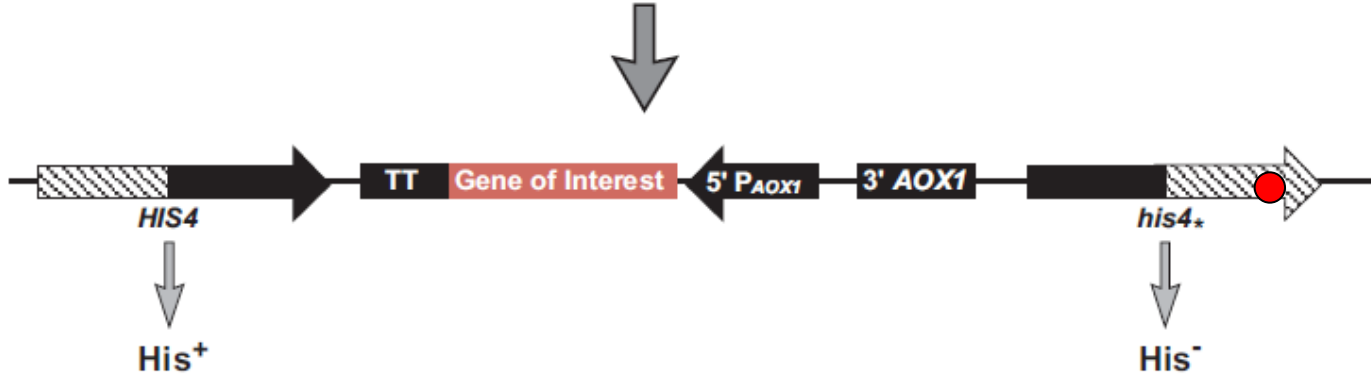
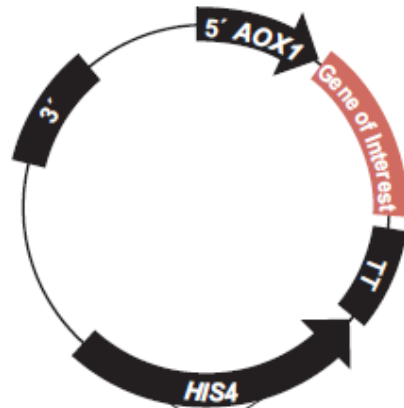
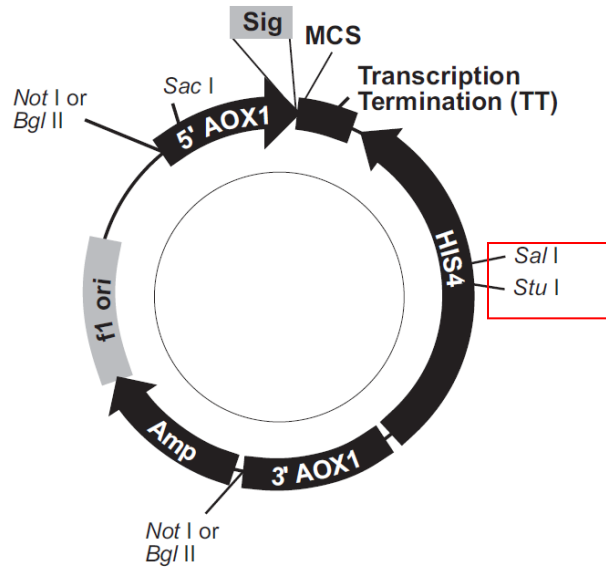
Integrace I.



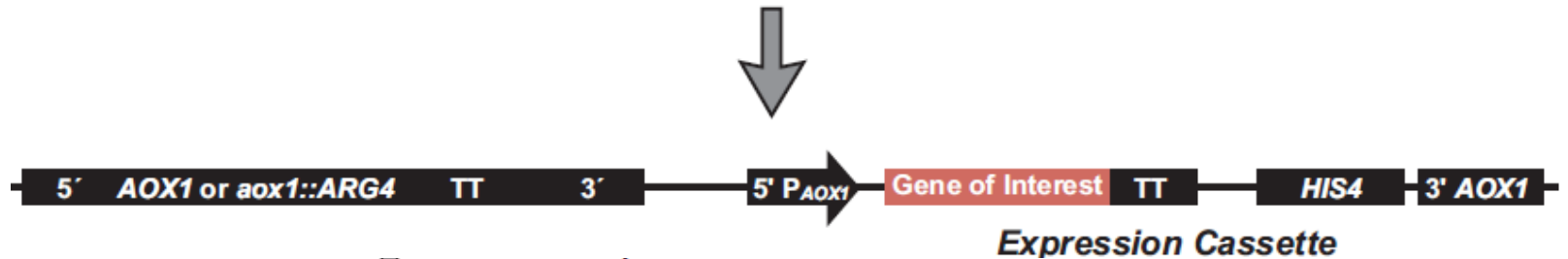
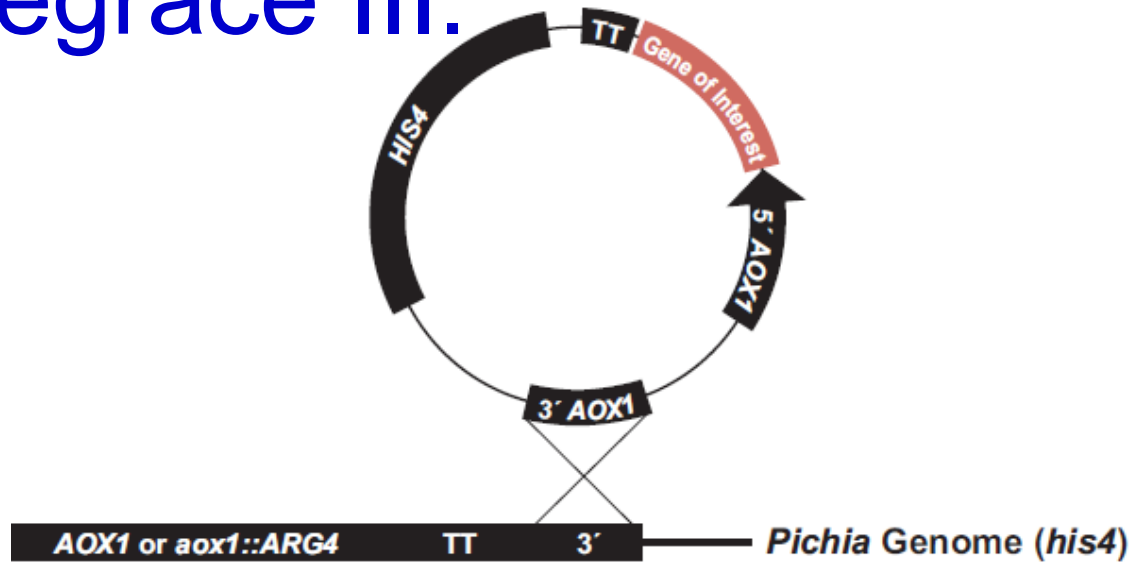
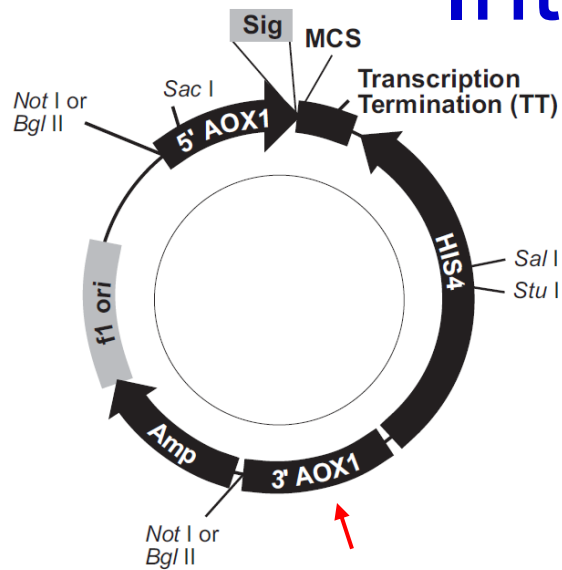
- integrativní plasmid pro *P.pastoris* (GS1115, genotype: *his4*)
- exprese z AOX1 promotoru



Integrace II.



Integrace III.



↓ 2nd Insertion Event

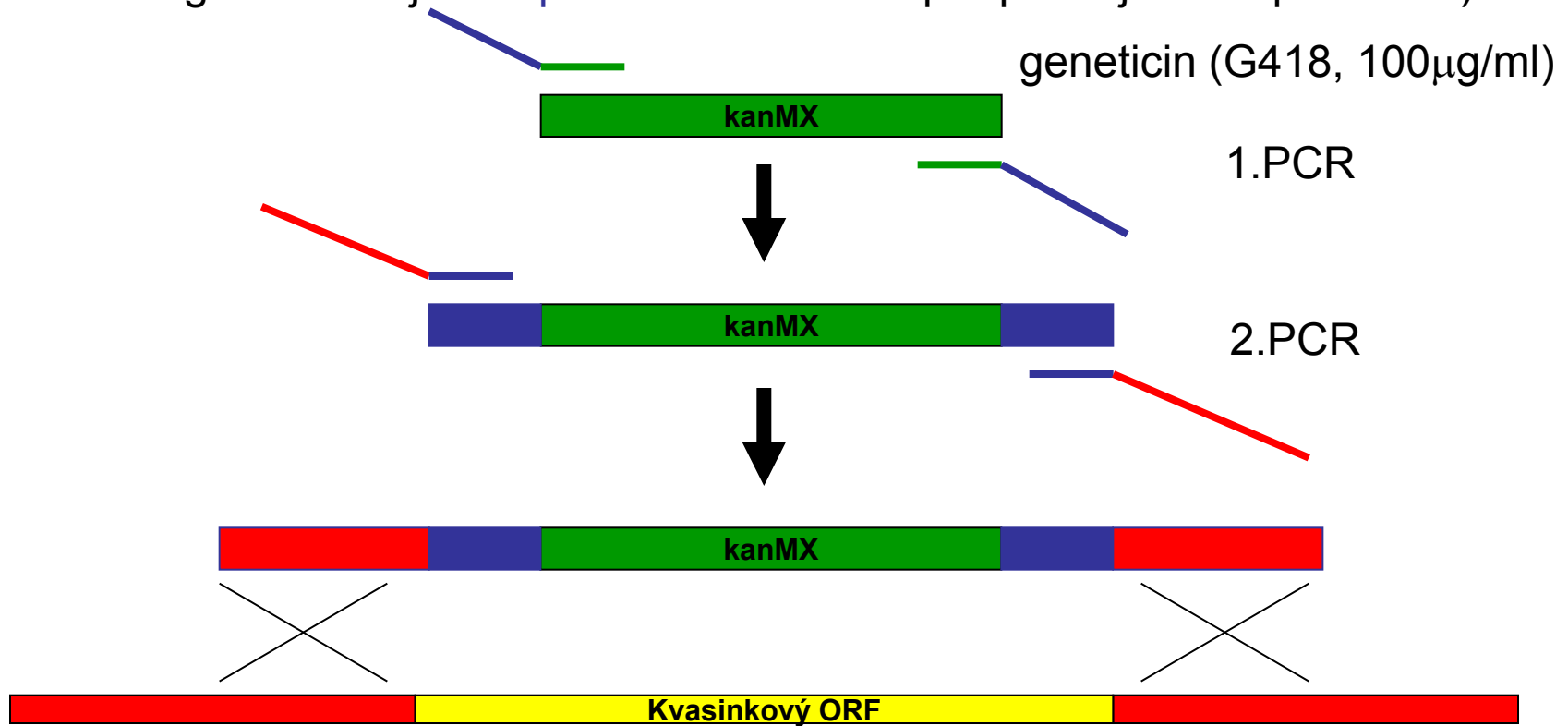


↓ 3rd Insertion Event, etc.

u *Pichia pastoris* dochází u 1-10% transformantů k vícenásobné integraci – vyšší exprese
Pomocí jiného markeru lze integrovat další kazetu

Delece genu - PCR

- pro rekombinaci stačí pouze **krátká homologie** (50nt)
- oligonukleotidy ~ 70nt dlouhé postačí (při 2 krokové PCR se kromě dlouhé homologie vnesou ještě **specifické sekvence** pro pozdější manipulace ...)

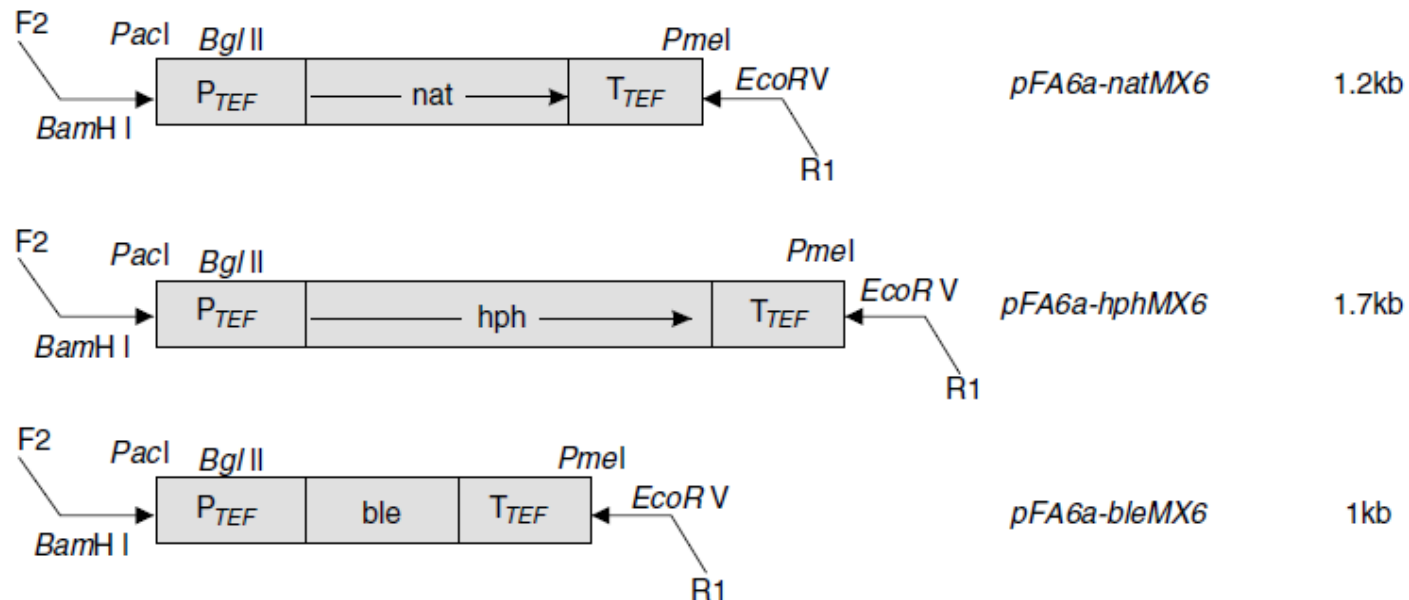


- systematicky provedeno na ~6000 genech v rámci projektu EuroFan
- kmeny lze získat z archivu EUROSCARF

<http://web.uni-frankfurt.de/fb15/mikro/euroscarf/index.html>

MX6 kazety

- **nourseothricin** (cloNAT) – inhibitor ribosomální proteosyntézy = miskodování (*Streptomyces noursei*), rezistence pomocí *nat1* genu (N-acetyltransferasa – monoacetyluje cloNAT)
- **hygromycin B** – inhibuje translokaci v průběhu translace (aminoglykosid z *Streptomyces hygrosopicus*), rezistence kódována *hph* genem z *Klebsiella pneumoniae*
- **phleomycin** – interkaluje se do DNA a způsobuje DSB (zlomy, glycopeptid z *Streptomyces verticulus*), rezistence kódována *ble* genem z *S. hindustanus*)

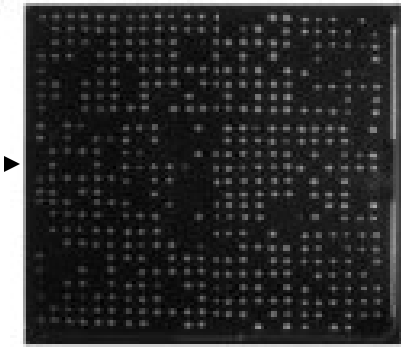


Hentges et al.: Yeast, 2005
Goldstein et al.: Yeast, 1999

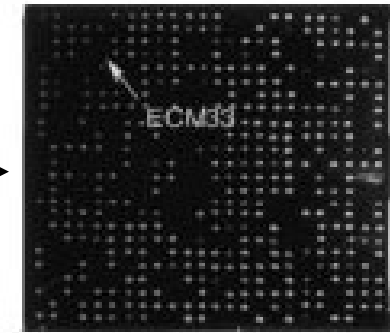
Společná struktura kazety – možnost záměny kazet (tytéž primery)

Delece genu pomocí transposonů

a



YPD



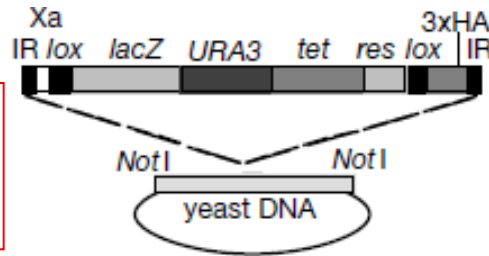
Hygro

Defekt buněčné stěny

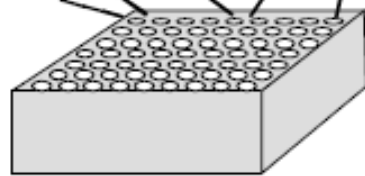
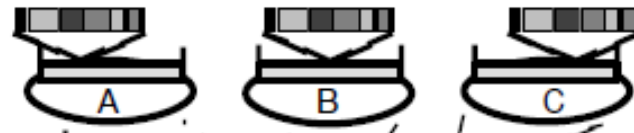
esenciální ▶

Citlivé ... ▶

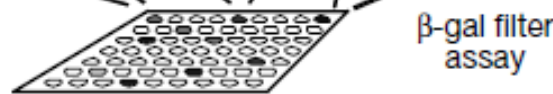
Library of mTn insertions in yeast DNA, generated in *E. coli*



Prepare DNA from individual plasmids

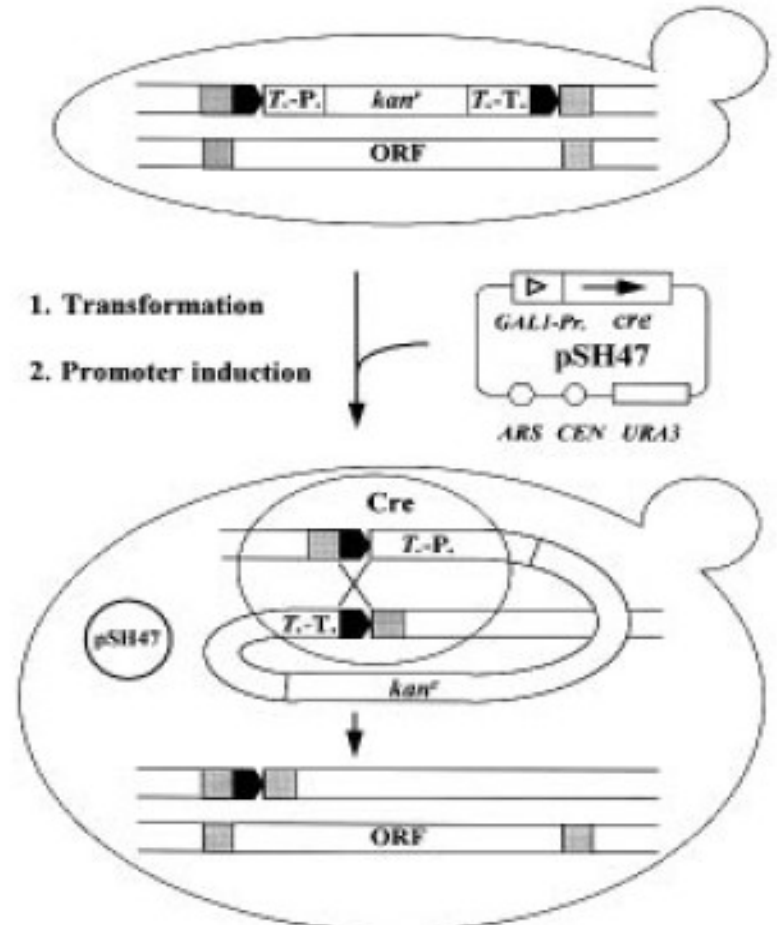
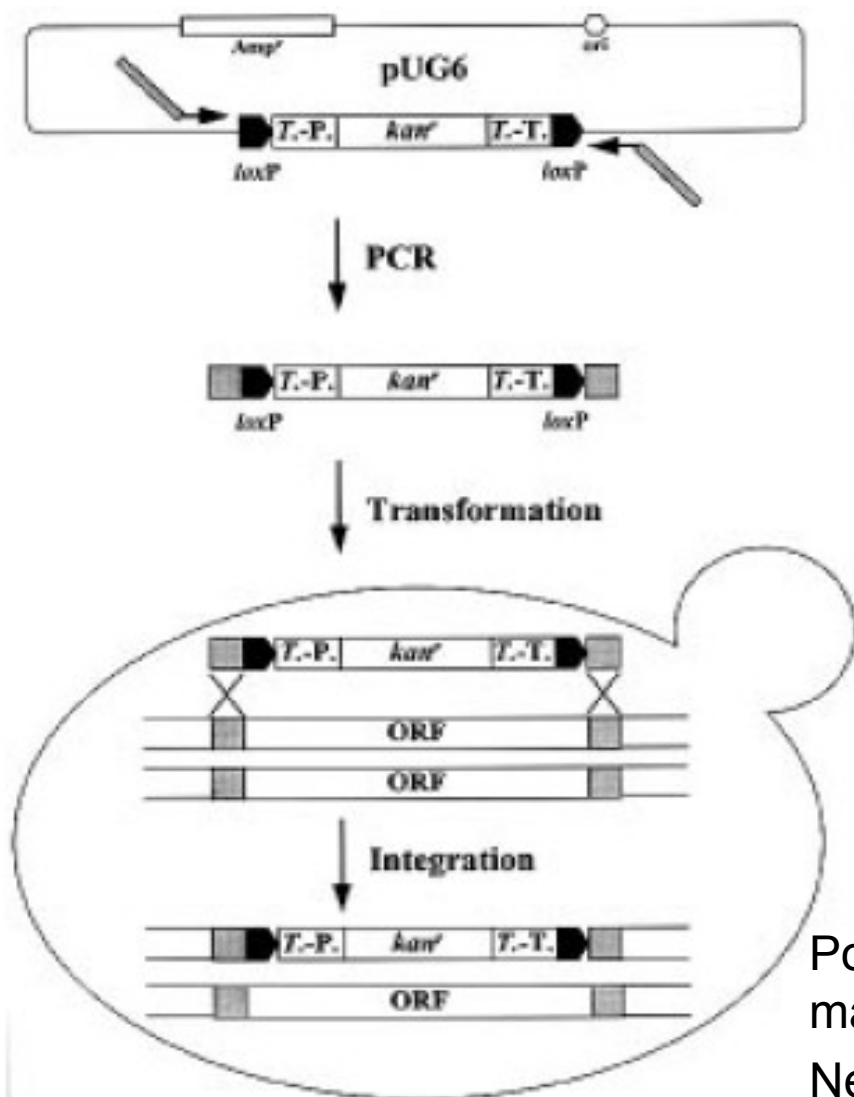


Cut with *NotI*; transform yeast



β -gal filter assay

Cre rekombinasa

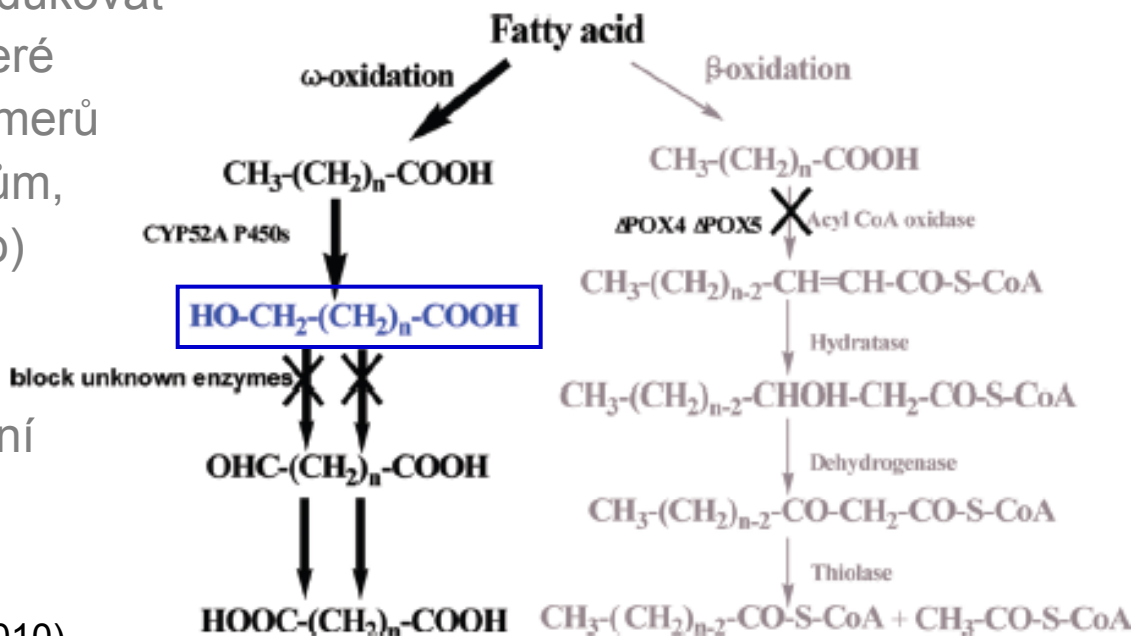


Postup lze použít několikrát se stále stejným markerem

Nevýhoda pro genetické studie (marker nekosegreguje s mutací)

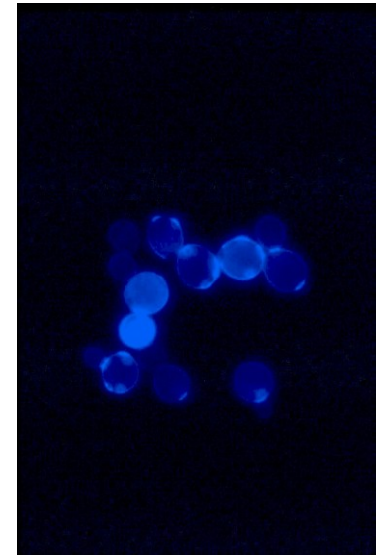
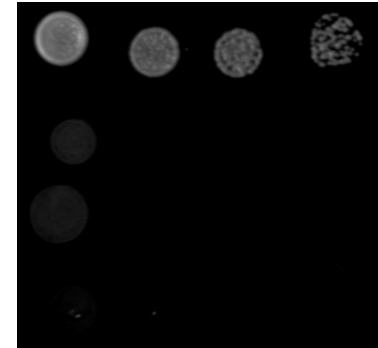
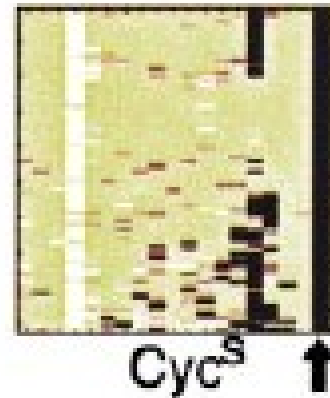
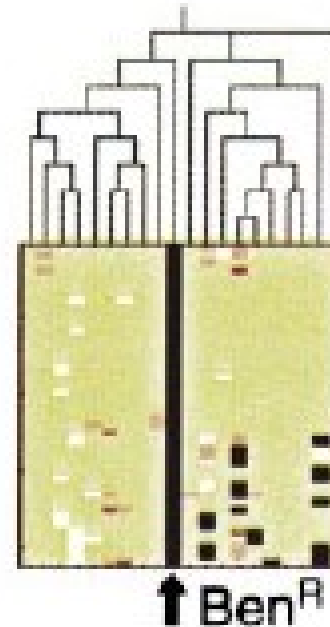
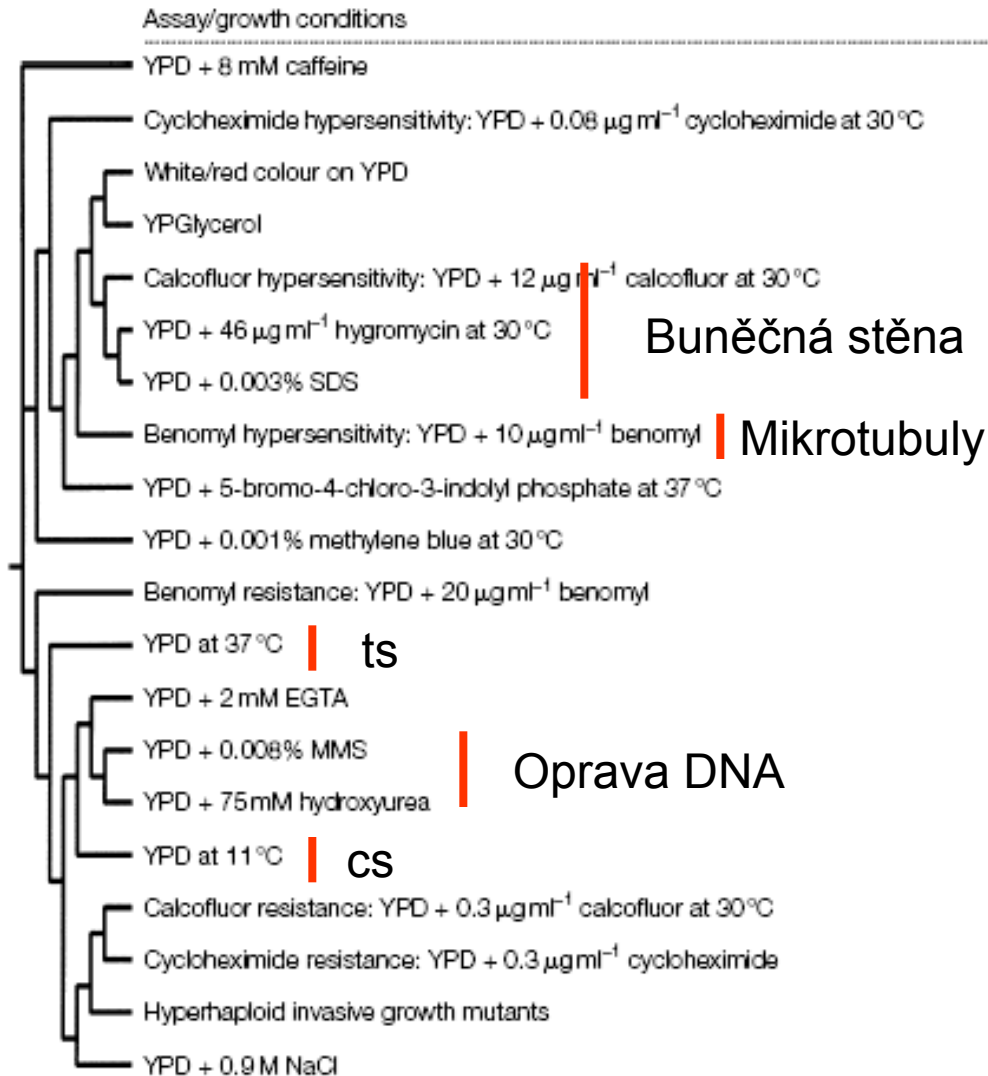
Příprava monomerů pro výrobu plastů – využití *Candida tropicalis*

- *Candida tropicalis* je schopna využít mastné kyseliny jako zdroj uhlíku (acetyl-CoA)
- mutantní kmen (Δ POX4, Δ POX5) není schopen β -oxidace a přeměňuje je oxidací na di-karboxylové kyseliny (Picataggio et al, Biotechnology, 1992)
- další mutagenezí (pomocí flp rekombinasy – viz genetika) odstranili geny dalších oxidás (4 alkohol oxidázy) a dehydrogenás (6 alkohol dehydrogenás) aby eliminovali ω -oxidaci
- nový kmen je schopen produkovat ω -hydroxymastné kyseliny, které lze použít pro výrobu bio-polymerů (plastů podobných polyetylenům, bio-odbouratelné na bio-palivo)
- další modifikace kmene (integrace genů pro lipázy) by umožnilo přímé odbourávání odpadních olejů ...



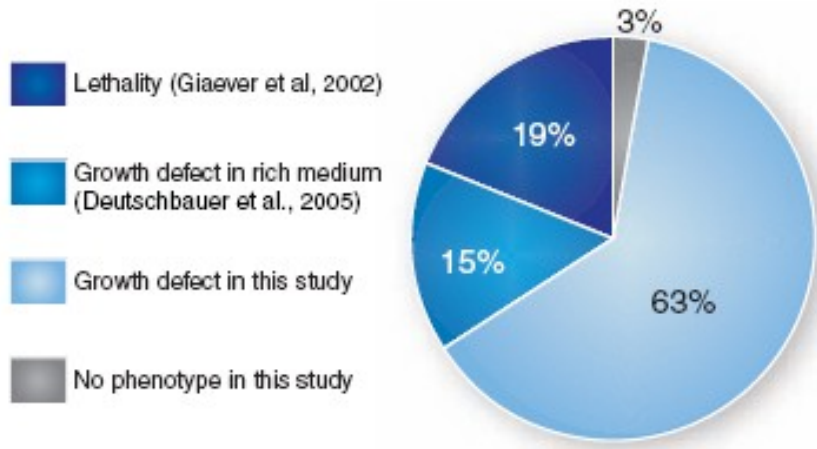
Lu et al., JACS (2010)

Testy fenotypu-funkce



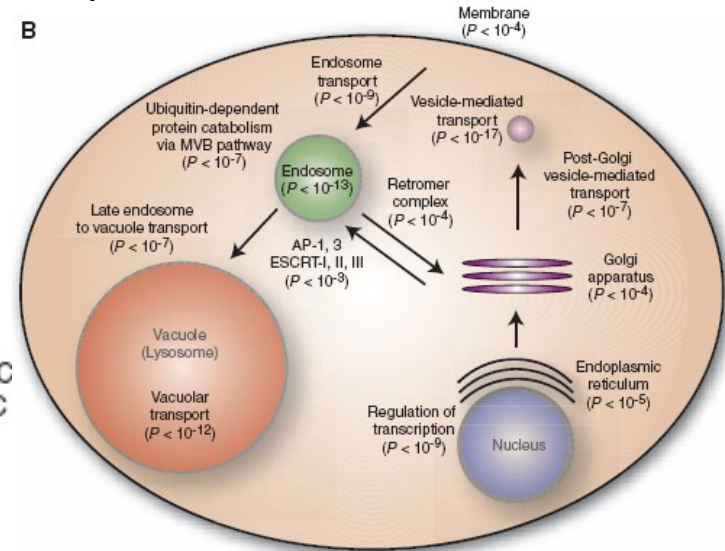
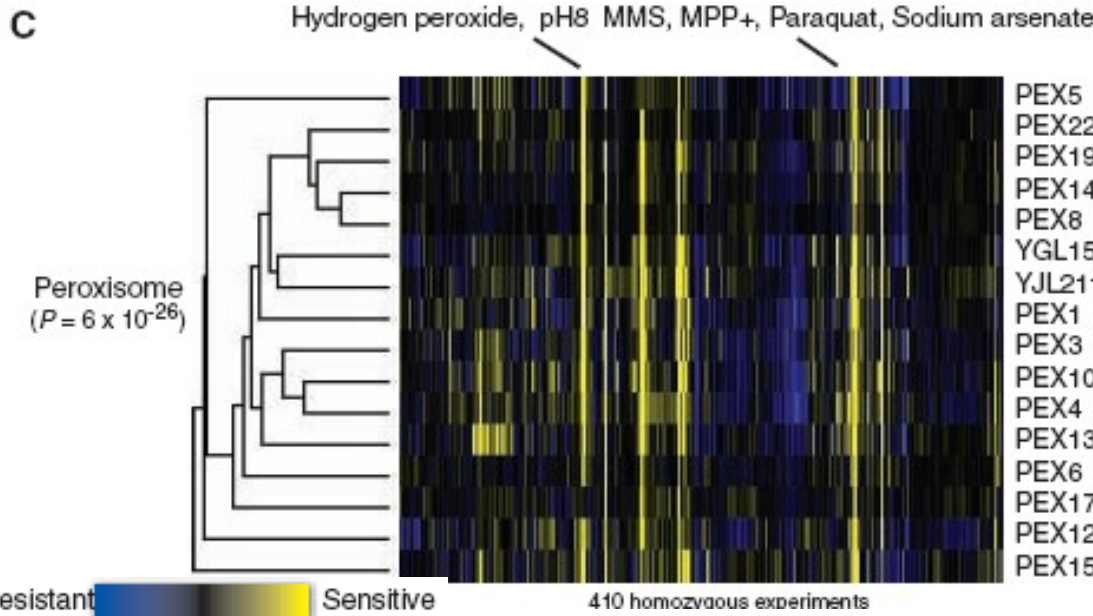
- Systematicky provedeno na >6000 genech v rámci projektu EuroFan
- Funkční kategorie genů – anotace v databázích

~ 6000 heterozygotních delečních kmenů (kvůli esenciálním genům – viz dál)
 ~ 5000 homozygotních delečních kmenů (+ ~ 1000 esenciálních genů)
 (neesenciální – růst za specifických podmínek nebo redundantní procesy)



- Testováno ~400 malých molekul a stresových podmínek (-aa ...)
 - Celkem provedeno ~ 6milionů testů
 - multidrug resistance (MDR) pokud byl gen potřebný pro resistenci vůči >20% z testovaných látek

- Podobné profily svědčí o funkční podobnosti



Science 320 (2008), p.362