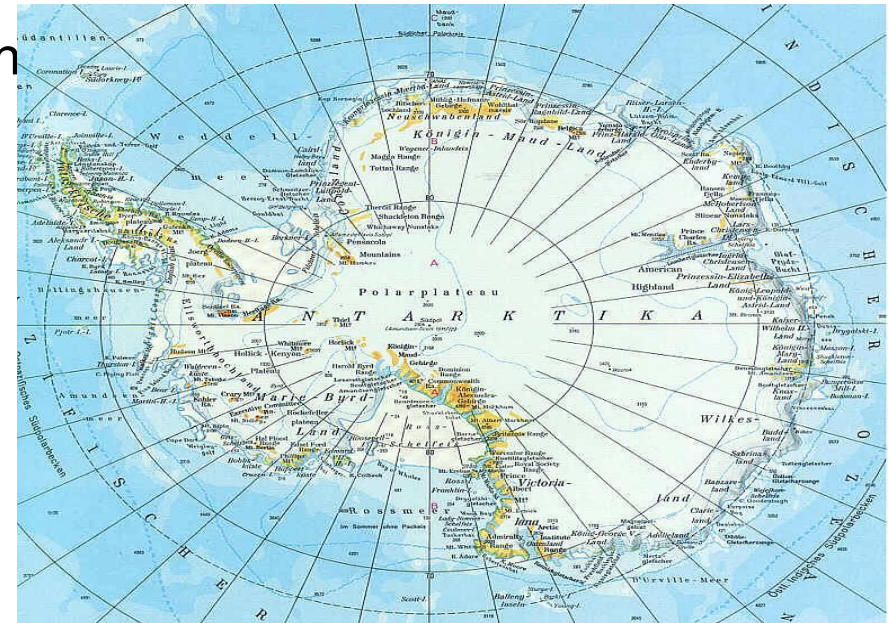


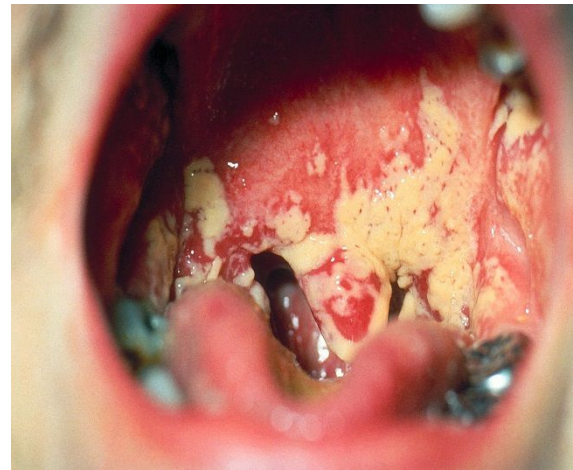
Osnova 3. přednášky

- Diagnostické metody
- Analytické metody
- Kvasinkové modelové organismy

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:

- z půdy: promývání v destilované vodě → homogenizace → třepačka
...
- klinické vzorky: tělní tekutiny, stěr nebo pomocí lepicí pásky ...
a pak vyšetří na Sabouraudův agar nebo bohaté médium → kultivace
2-7 dní při teplotách 22-42°C (37°C)

Lékařská mykologie – Bi3390

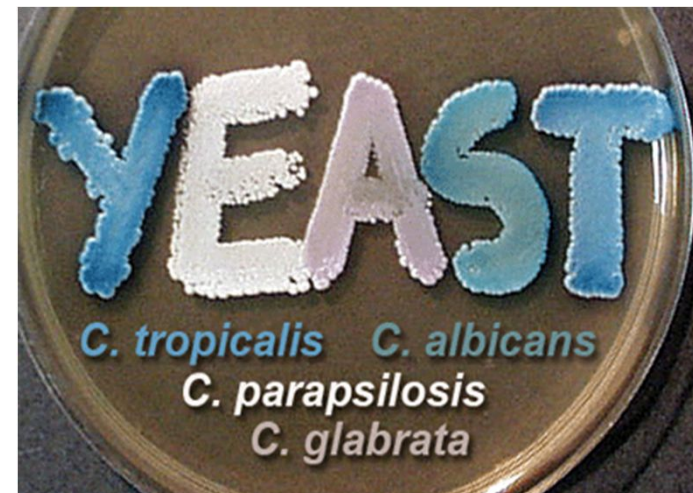


identifikace/analýza:

- fenotypové metody – morfologie kolonií, morfologie buněk (...spor)
- biochemické vlastnosti (fermentace cukrů, asimilace uhlíkatých nebo dusíkatých substrátů ... růst na chromogenních plotnách)

moderní metody

- PCR (nested, multiplex, RFLP),
- sekvenační (NGS technologie),
- hmotnostní spektrometrie



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

Tab. 1 – Nejčastěji používané metody pro identifikaci kvasinek

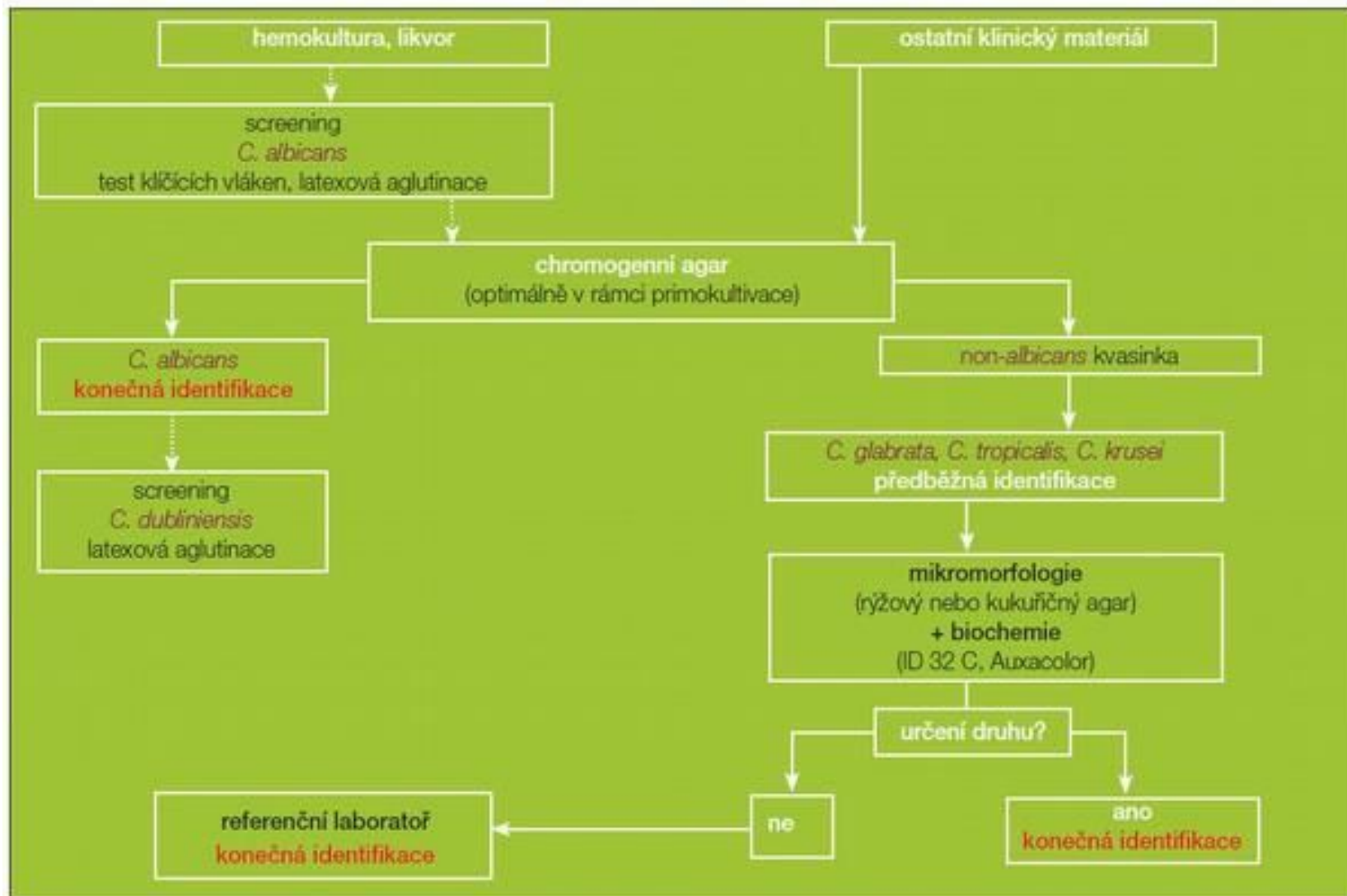
Charakter identifikace	Princip	Způsob detekce	Hodnocení
orientační	selektivní a diagnostické půdy	aktivita enzymů, produkce pigmentu	fluorescence, barevná změna
	mikromorfologie	nativní preparát	klíční hyfy
	sérologie	monoklonální protilátky	aglutinace
	enzymatické testy	aktivita enzymů	barevná změna
podrobná	mikromorfologie	nativní preparát	chlamydospory artrospory 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“

<http://zdravi.e15.cz/clanek/postgradualni-medicina-priloha/identifikace-kvasinek-z-klinickeho-materialu-prehled-soucasnych-moznosti-se-zamerenim-na-fenotypove-metody-a-komerzni-produkty-455847>

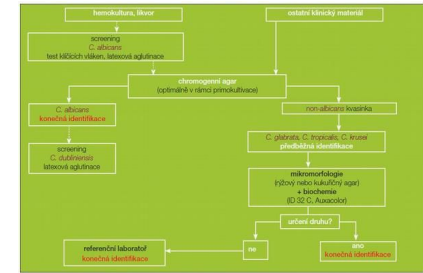
doc. P. Hamal, UP Olomouc

Postup klinického vyšetření



<http://zdravi.e15.cz/clanek/postgradualni-medicina-priloha/identifikace-kvasinek-z-klinickeho-materialu-prehled-soucasnych-moznosti-se-zamerenim-na-fenotypove-metody-a-komercni-produkty-455847>

Fenotypové metody



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

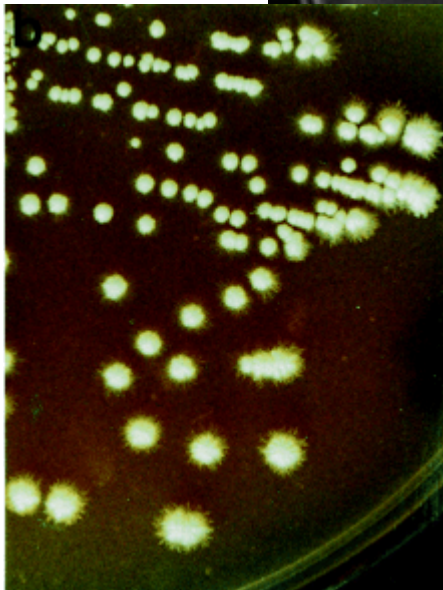
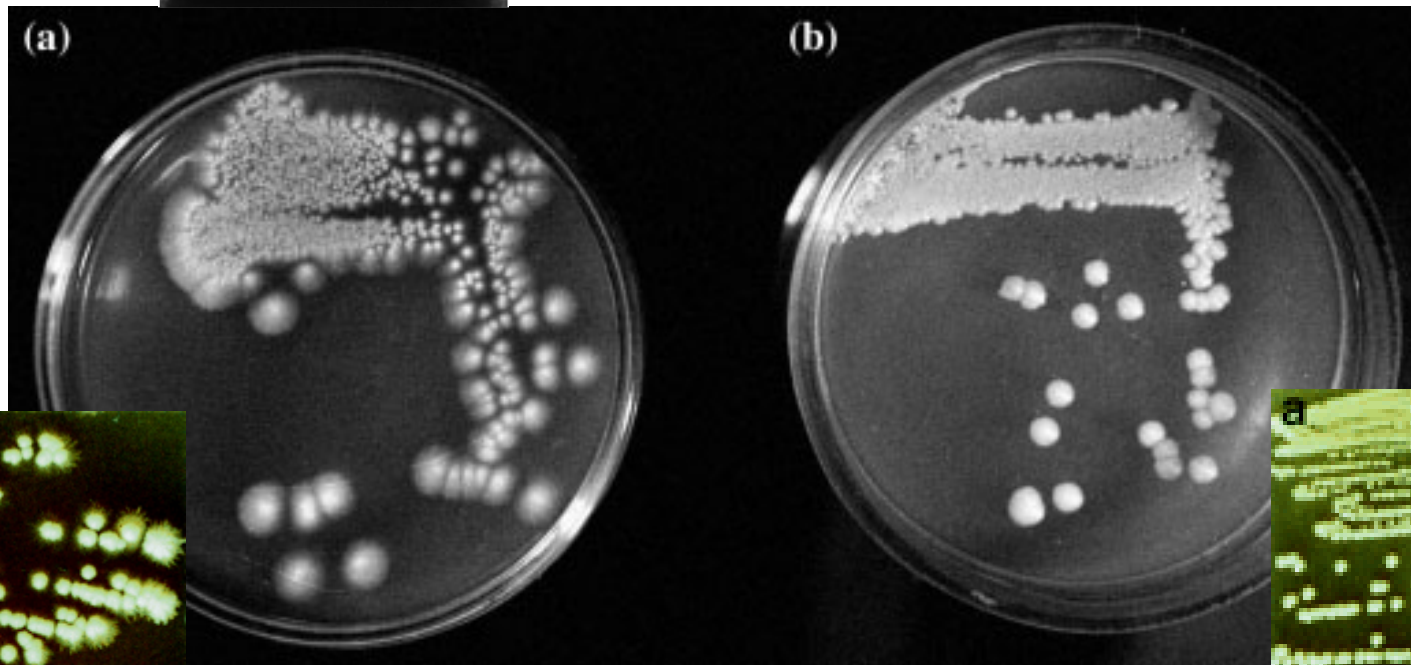
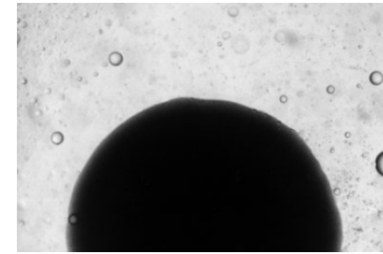
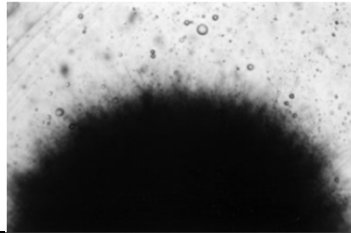


C. dubliniensis: nadbytek chlamydospor na koncích krátkých pseudohyf

- test klíčnicí hyf, *C. albicans* přímo z pozitivních hemokultur na kaseinový agar nebo kukuřičný agar (různý výsledek)

Agar	Basis of differentiation	<i>C. albicans</i>	<i>C. dubliniensis</i>
Cornmeal–Tween 80 medium; rice agar–Tween medium; Pal’s medium	Chlamydospore 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	Chlamydospore production	Chlamydospore absent	Chlamydospore abundant

Mikromorfologie - Kolonie



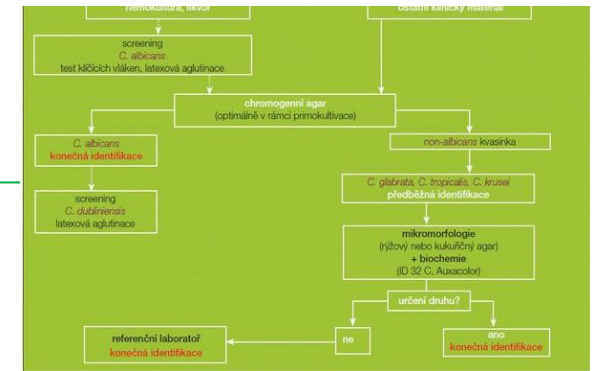
Staibûv agar (37°C)

C. dubliniensis

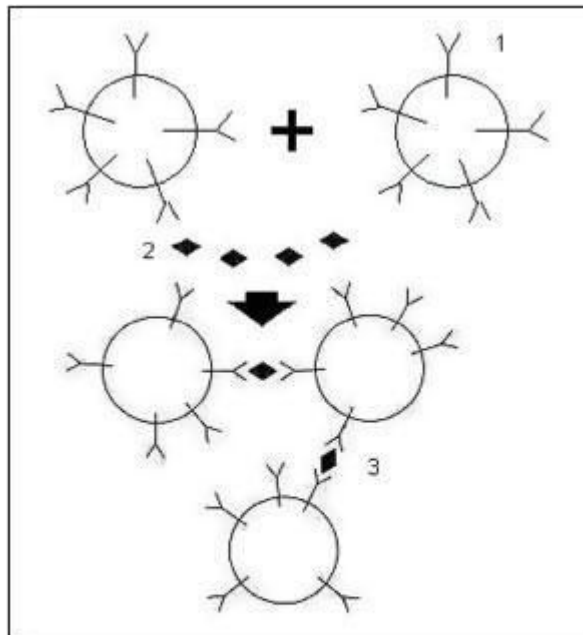
C. albicans

Sérologické testy

- souprava latron Serological Candida Check Kit (latron Laboratories) nebo Bichro-latex Albicans (Fumouze Diagnostics)



Specifické protilátky proti antigenům buněčné stěny (omezené ...)



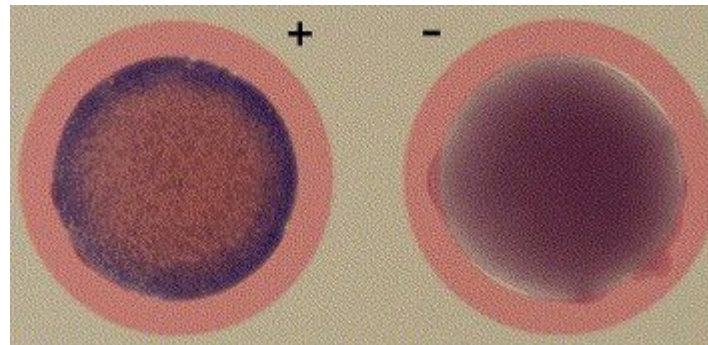
Obr. 2: 1 – latexová částice s navázanou specifickou protilátkou na povrchu; 2 – virová částice; 3 – shluk latexových částic s viry, který vytváří zákal ve vzorku

Totéž platí pro kvasinky

Latexová aglutinace

C. dubliniensis

C. albicans



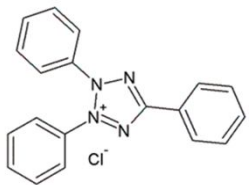
Teplotní test

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

Chromogenní testy

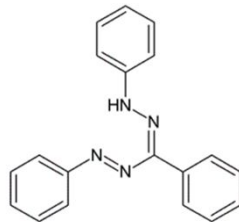
- test enzymových aktivit - chromogenní substráty – např. tetrazoliové soli
- „Zlatý standard“ – půda vyvinutá Rambachem - CHROMagar Candida (CHROMagar Microbiology, v ČR Colorex Candida od Trios)

tetrazoliová sůl



TPH (White color)

electron donor (eg NADH)
Succinate dehydrogenase
redukce

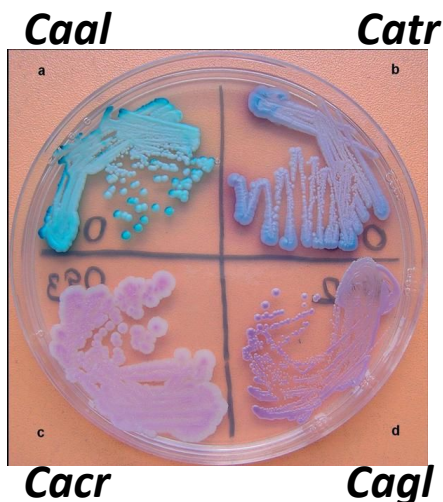


TPF (Red Color)

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



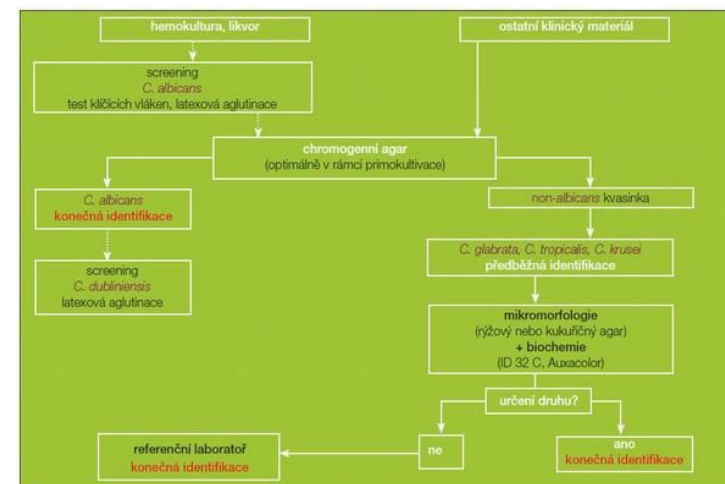
ATCC 13803 (*C. tropicalis*) at 48 h.



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

Chromogenní testy

Výše uvedené metody se používají běžně v klinických laboratořích
Jsou k dispozici kompletní sady souprav

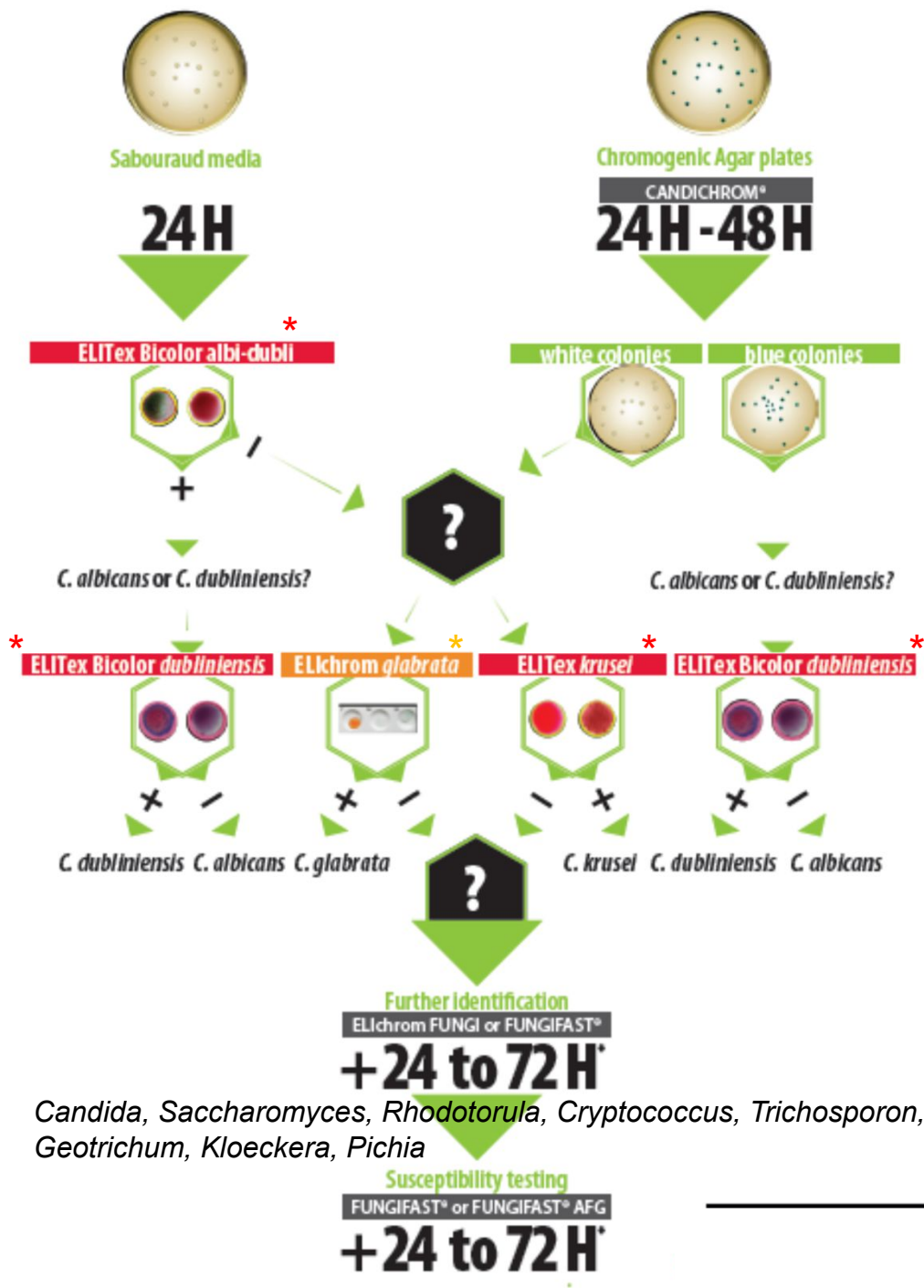


Tab. 2 – Selektivně diagnostické půdy pro předběžnou identifikaci kvasinek

Registrovaný název	Typ	Výrobce	Detekované druhy
CHROMagar Candida	chromogenní	CHROMagar Microbiology	CAAL, CATR, CAKR, CAGL
CandiSelect 4	chromogenní	Blo-Rad Laboratories	CAAL, CATR, CAKR, CAGL
HardyCHROM Candida	chromogenní	Hardy Diagnostics	CAAL, CATR, CAKR, CAGL
Brilliance Candida Agar	chromogenní	Oxoid	CAAL, CATR, CAKR, (skupina CAGL, CAPA, CALU, CAKE)
Candida Chromogenic Agar	chromogenní	Laboratorios Conda	CAAL, CATR, CAKR (CAPA, CALU)
BBL Chromagar Candida	chromogenní	BD Diagnostics	CAAL, CATR, CAKR
Candida ID 2	chromogenní	bioMérieux	CAAL (skupina CATR, CALU, CAGU, CAKE)
Candichrom II	chromogenní	ELITech Group	CAAL
Fluoroplate Candida	fluorogenní	Merck Chemicals	CAAL

CAAL – *Candida albicans*, CATR – *Candida tropicalis*, CAKR – *Candida krusei*, CAGL – *Candida glabrata*, CAPA – *Candida parapsilosis*, CALU – *Candida lusitanae*, CAKE – *Candida kefyr*, CAGU – *Candida guilliermondii*

<http://zdravi.e15.cz/clanek/postgradualni-medicina-priloha/identifikace-kvasinek-z-klinickeho-materialu-prehled-soucasnych-moznosti-se-zamerenim-na-fenotypove-metody-a-komercni-produkty-455847>



Příklad analýzy:

CANDIchrom – chromogenní metoda (enzymatická přeměna tetrazoliové soli) 1-2 dny

***ELITex** – latexové aglutinační metody (protilátky) 5 minut

***ELIchrom** – biochemický test (aktivita trehalasy) 20 minut

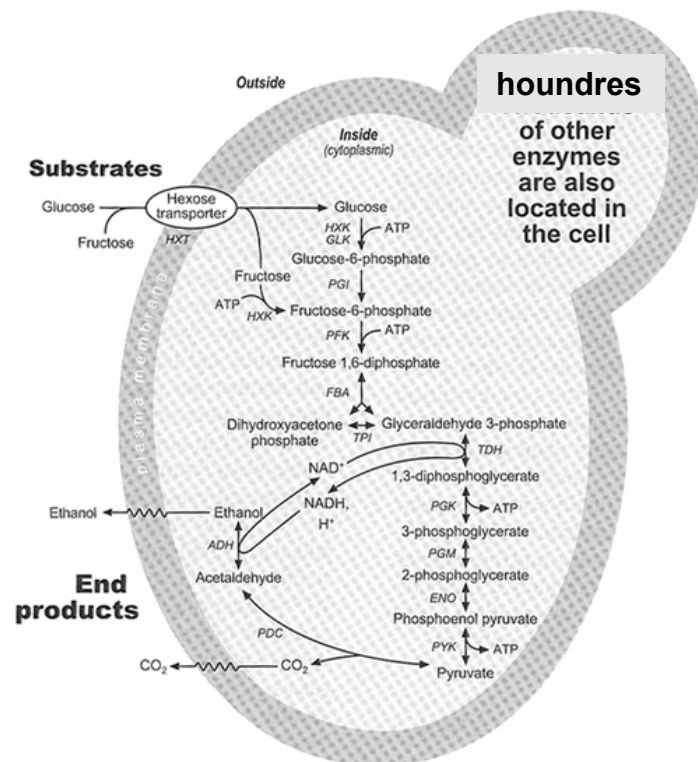
ELIchromFUNGI – biochemické testy 1-2 dny



Biochemické testy

- Biochemické parametry – založeny na schopnosti utilizace uhlíkatých látek (cukrů), utilizace dusíkatých látek (hydrolýza močoviny - ureasa)
- Tato schopnost se odvíjí od metabolických schopností daného druhu – přítomnosti specifických enzymů (především fosfatázy, β -glukosidáza, β -N-acetylhexosaminidázy)

biochemie	asimilace	Intenzita zákalu barevná změna
	fermentace	produkce CO ₂



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	+	-

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

Biochemická charakteristika

- Rhodotorula

- Ureáza +
- KNO₃ utilizace -
- Fermentace
 - Mal, Lac, Sac, Glc –
- Asimilace sacharidů
 - **Mal+** Sac+ Lac-
 - Raf+ Mlz+
 - Xyl+ **Ara+**
 - Inl- Aml-
 - Cel+ Tre+

- Sporidiobolus

- Ureáza +
- KNO₃ utilizace –
- Fermentace
 - Mal, Lac, Sac, Glc –
- Asimilace sacharidů
 - Mal- Sac+ **Lac+**
 - Raf+ Mlz+
 - Xyl+ Ara-
 - Inl- **Aml+**
 - Cel+ Tre+

Mal – maltosa, Lac – laktosa, Ara – arabinosa, Aml - amylosa

YT MicroPlate™ Je možné určit až 267 druhů kvasinek z 53 rodů
(ale pouze 50% spolehlivost)

A1 Water	A2 Acetic Acid	A3 Formic Acid	A4 Propionic Acid	A5 Succinic Acid	A6 Succinic Acid Mono-Methyl Ester	A7 L-Aspartic Acid	A8 L-Glutamic Acid	A9 L- Proline	A10 D-Gluconic Acid	A11 Dextrin	A12 Inulin
B1 D-Cellobiose	B2 Gentiobiose	B3 Maltose	B4 Maltotriose	B5 D-Melezitose	B6 D-Melibiose	B7 Palatinose	B8 D-Raffinose	B9 Stachyose	B10 Sucrose	B11 D-Trehalose	B12 Turánose
C1 N-Acetyl-D-Glucosamine	C2 α-D-Glucose	C3 D-Galactose	C4 D-Psicose	C5 L-Sorbose	C6 Salicin	C7 D-Mannitol	C8 D-Sorbitol	C9 D-Arabitol	C10 Xylitol	C11 Glycerol	C12 Tween 80
D1 Water	D2 Fumaric Acid	D3 L-Malic Acid	D4 Succinic Acid Mono-Methyl Ester	D5 Bromo-Succinic Acid	D6 L-Glutamic Acid	D7 γ-Amino-Butyric Acid	D8 α-Keto-Glutaric Acid	D9 2- Keto-D-Gluconic Acid	D10 D-Gluconic Acid	D11 Dextrin	D12 Inulin
E1 D-Cellobiose	E2 Gentiobiose	E3 Maltose	E4 Maltotriose	E5 D-Melezitose	E6 D-Melibiose	E7 Palatinose	E8 D-Raffinose	E9 Stachyose	E10 Sucrose	E11 D-Trehalose	E12 Turánose
F1 N-Acetyl-D-Glucosamine	F2 D-Glucosamine	F3 α-D-Glucose	F4 D-Galactose	F5 D-Psicose	F6 L-Rhamnose	F7 L-Sorbose	F8 α-Methyl-D-Glucoside	F9 β- Methyl-D-Glucoside	F10 Amygdalin	F11 Arbutin	F12 Salicin
G1 Maltitol	G2 D-Mannitol	G3 D-Sorbitol	G4 Adonitol	G5 D-Arabitol	G6 Xylitol	G7 i-Erythritol	G8 Glycerol	G9 Tween 80	G10 L-Arabinose	G11 D-Arabinose	G12 D-Ribose
H1 D-Xylose	H2 Succinic Acid Mono-Methyl Ester plus D-Xylose	H3 N-Acetyl-L-Glutamic Acid plus D-Xylose	H4 Quinic Acid plus D-Xylose	H5 D-Glucuronic Acid plus D-Xylose	H6 Dextrin plus D-Xylose	H7 α-D-Lactose plus D-Xylose	H8 D-Melibiose plus D-Xylose	H9 D-Galactose plus D-Xylose	H10 m-Inositol plus D-Xylose	H11 1,2-Propanediol plus D-Xylose	H12 Acetoin plus D-Xylose

FIGURE 1. Carbon Sources in YT MicroPlate



Oxidation Tests



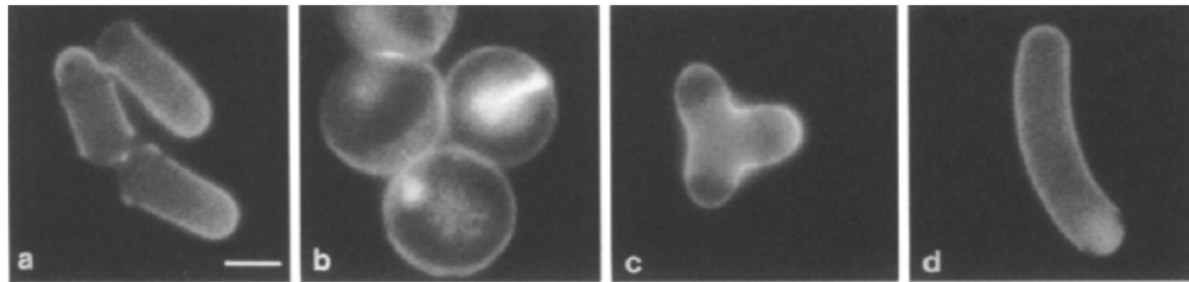
Assimilation Tests

nárust kvasinek

Molekulární taxonomie

-konvenční taxonomie je problematická :

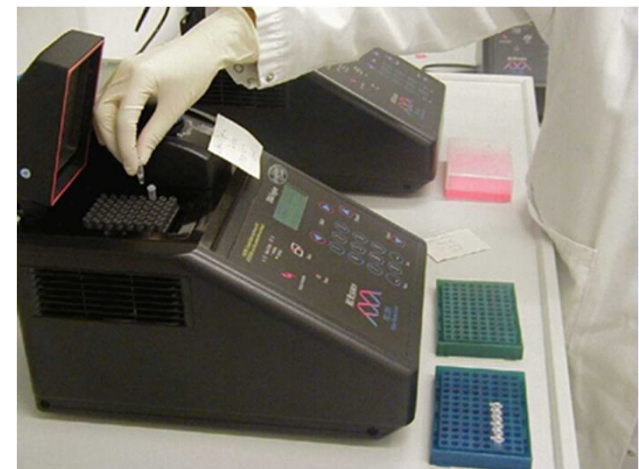
- morfologie kvasinek není stabilní → roztěr a nárůst trvá několik dní (prodlužuje se včasná diagnóza ...) –
- molekulární taxonomie (komerční účely - odlišit kmeny *S.c.*)
 - pulsní gelová elektroforéza (PFGE), FISH (karyotyp)
 - PCR, restrikční polymorfismus (odlišení druhů)
 - nejnověji MALDI-TOF (taxonomie)



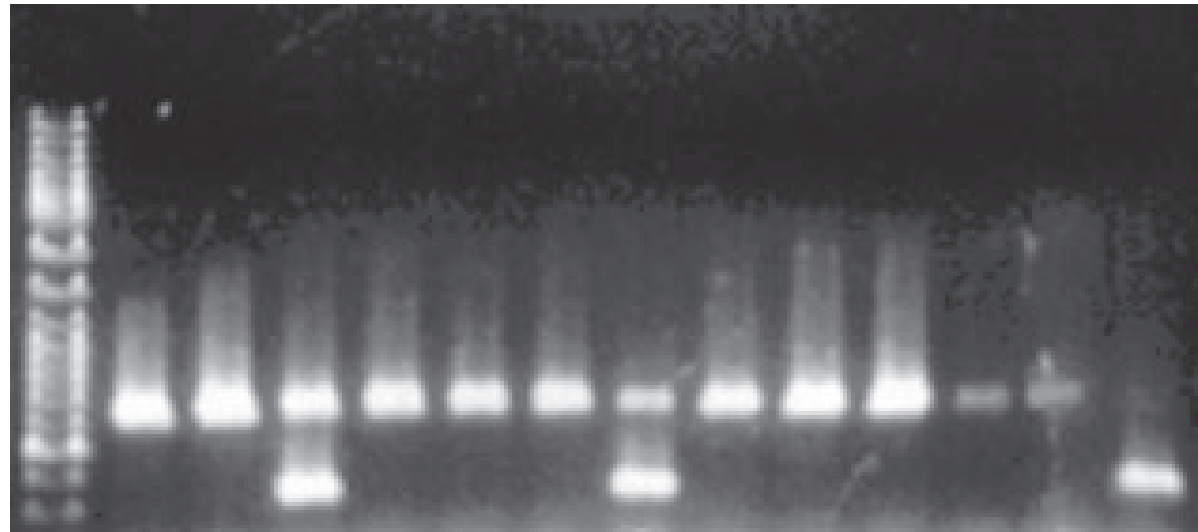
- většinu morfologických nebo enzymatických ... charakteristik lze zvrátit mutací (v jediném genu)

Identifikace založená na odlišnosti typických sekvencí DNA

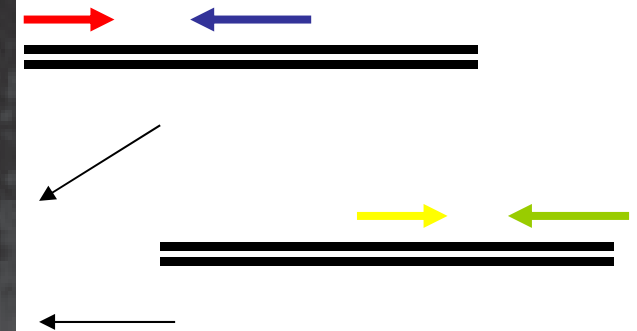
- obtížná izolace DNA, proteinů ... z kvasinek
- je třeba nejdříve narušit silnou buněčnou stěnu ... pomocí enzymů nebo mechanicky
- poté PFGE nebo dále extrahovat DNA (např. fenol-chloroform, poté srážení etanolem)
- specifické sekvence lze identifikovat pomocí Southern blotu nebo PCR
 - izolace DNA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



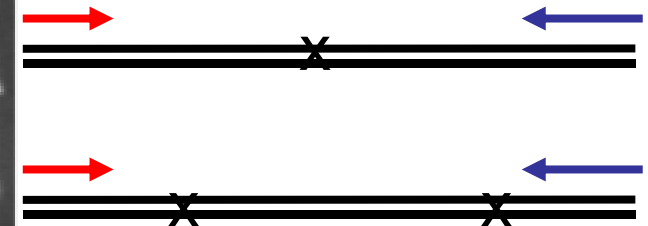
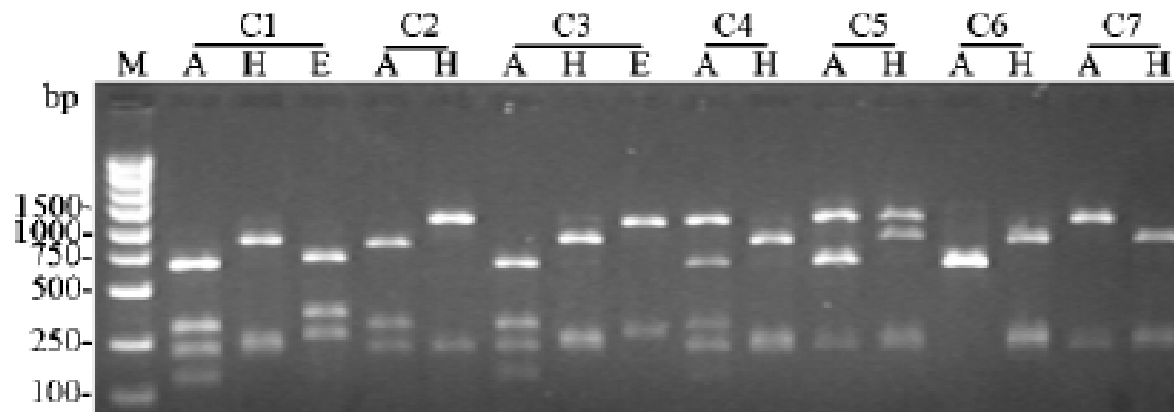
- 1. sada primerů je universální kvasinková (pozitivní kontrola, vyšší proužky) a 2. sada primerů je druhově specifická (méně konzervovaný úsek DNA) - separace gelovou elektroforézou (barvení ethidium bromidem, UV transiluminátor)



PCR

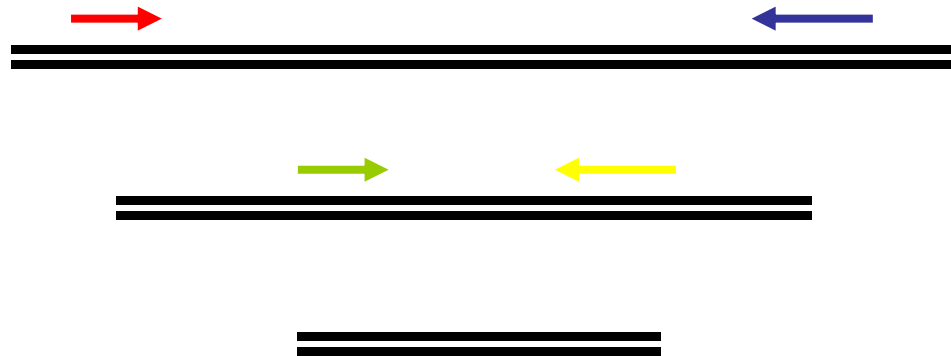


- po PCR může následovat štěpení restriční endonukleasou a odlišení druhů na základě odlišné délky štěpných produktů (tzv. **RFLP** – restriction fragment length polymorfism)



Nested („zahnížděná“) PCR

- amplifikace probíhá dvoufázově
- v 1. fázi je pomocí jedné sady primerů (**kvasinková**) namnožena delší sekvence nukleové kyseliny
- takto získané amplikony jsou pak přeneseny do jiné amplifikační zkumavky obsahující druhou dvojici primerů (**druhová**), 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	TCGAGTGCATAACCACACTCGAG	57
	Reverse	TACGGTGCTTTCACGGTTCT	
<u><i>M. japonica</i></u>	Forward	CGTATGTGGATCTTATCCTAT	44
	Reverse	TGACTAGTGTCTAGGCACGGTA	
<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

- amplifikace se směsí primerů (jeden univerzální, druhý specifický)



Candida glabrata
397bp

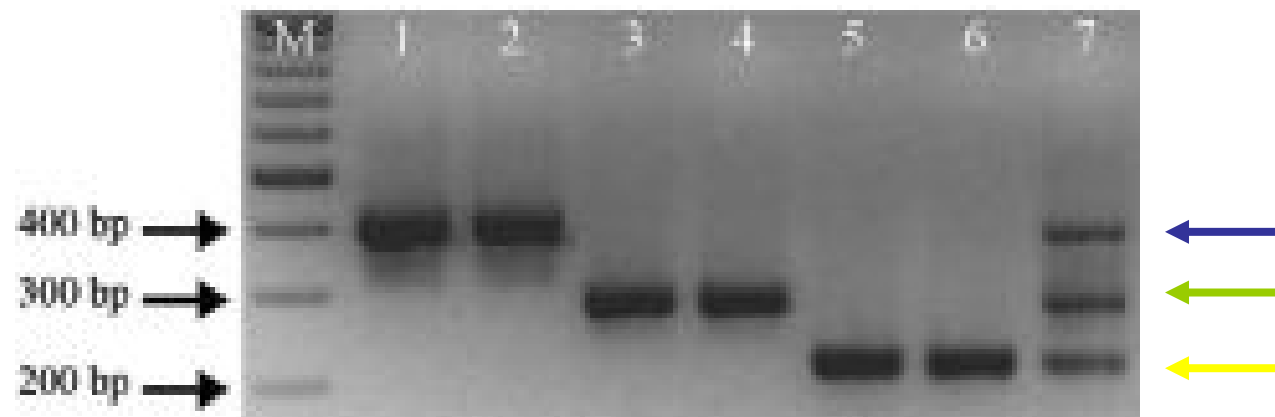


Candida nivariensis
293bp



Candida braccarensis
223bp

univerzální
primer (konzervativní oblast 5.8S rDNA)

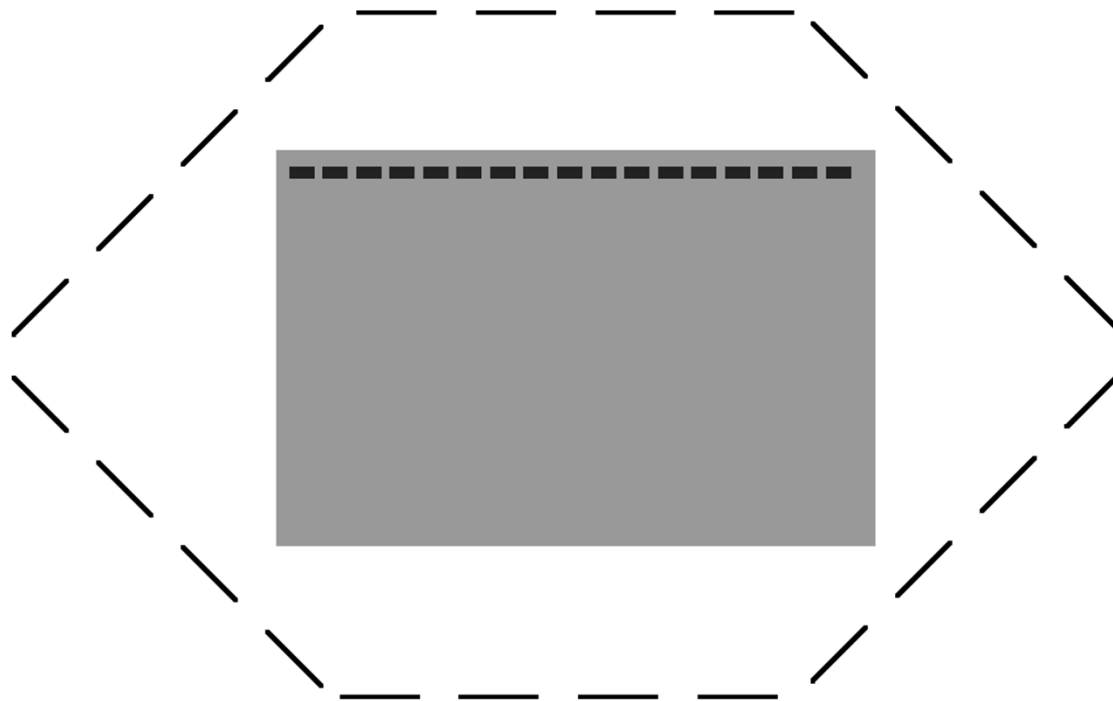


PFGE

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

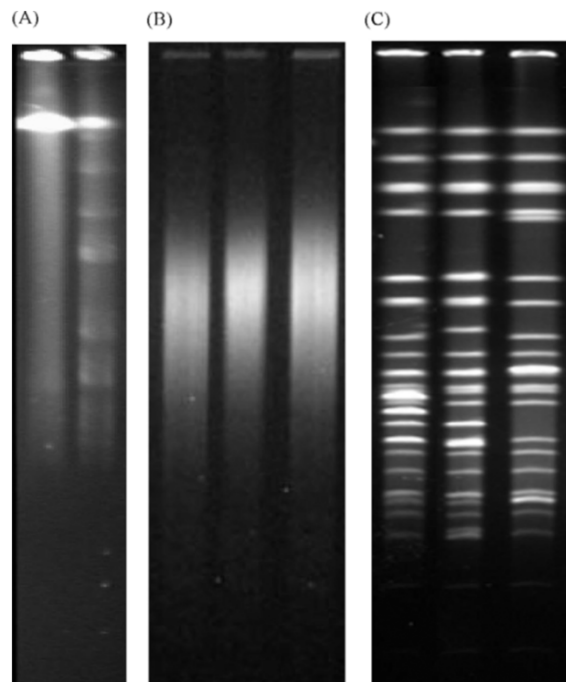
PFGE = pulse field gel electrophoresis (elektroforéza s měnícím se elektrickým polem, při změně směru elektrického pole trvá větším molekulám DNA déle, než se přeorientují - umožňuje separovat molekuly velké několik Mb)

- contoured clamped homogeneous electric field (CHEF)
- gel obsahuje vzorky DNA uvnitř agarózových bločků (minimalizace náhodných zlomů velkých molekul DNA)



Karyotypizace

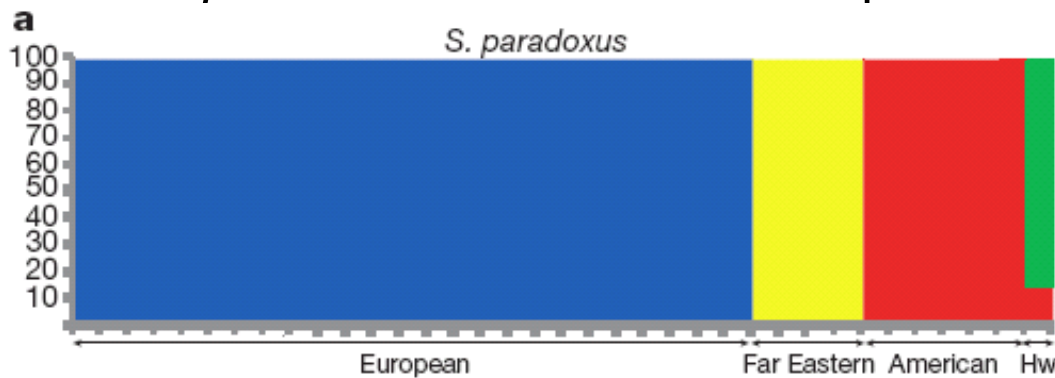
- *S.c.* kmeny mají podobný karyotyp – většinou se liší délkou chromosomu XII (podle počtu rDNA genů)
- Průmyslové kvasinky jsou většinou polyploidní – homologní chromosomy mají odlišné velikosti
- Srovnání kmenů pro fylogenetické účely (intaktní nebo RE naštěpené chromosomy)
- Určení příbuznosti izolátů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



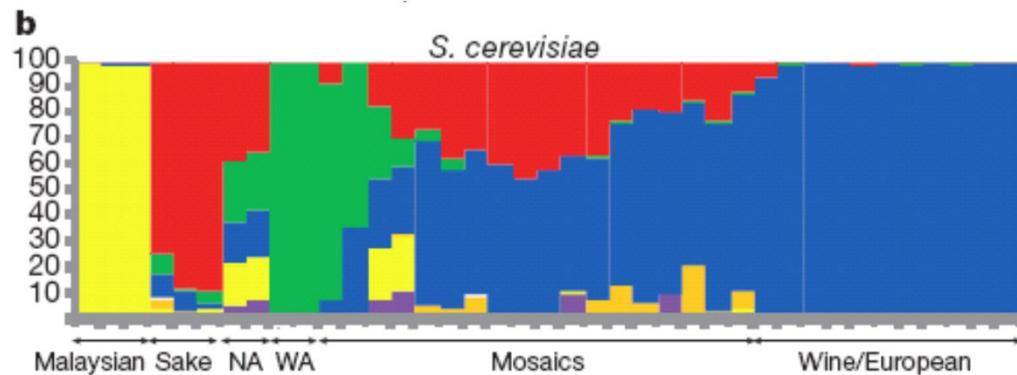
- (A) Nekompletní naštěpení RE
- (B) Degradace nukleázou
- (C) Oprava přidáním 75 mM thiourey do pufru

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

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

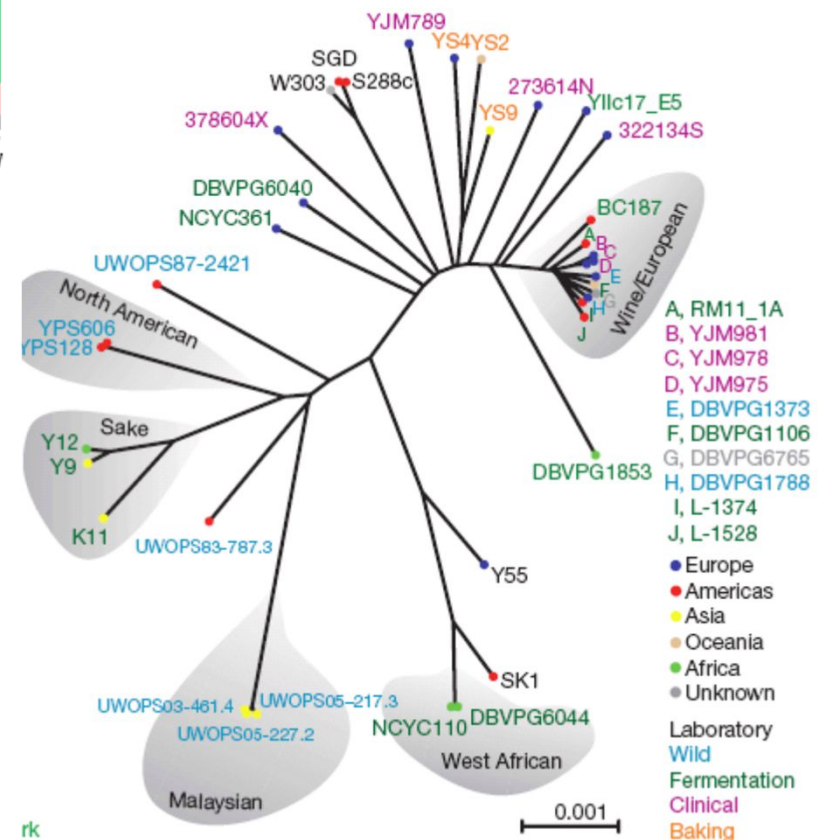


- *S. cerevisiae* - 3-4 původní linie, které se díky člověku křížily ...



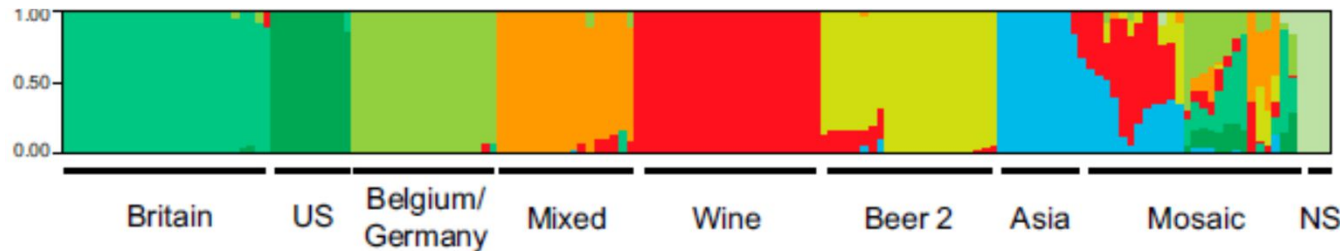
- ukazují na geografickou závislost

Nature 458, (2009), p337



Studie populací *S. cerevisiae*

- NGS sekvenace > 100 kmenů z různých koutů světa a různých biotechnologií
- (SNPs) ukazují na geografickou závislost

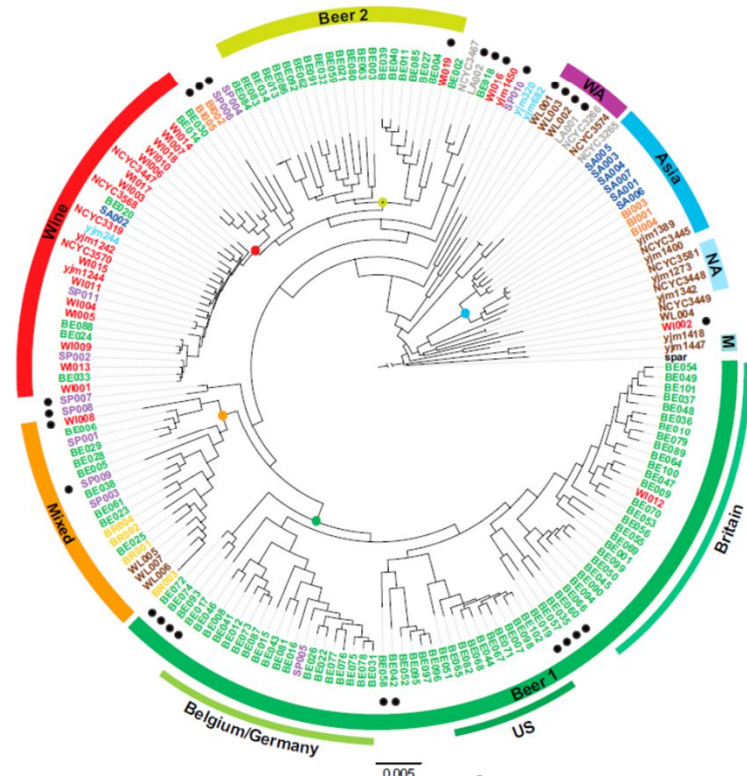


pivní linie ve VB, US, Belgii ... a další linie č.2

sake v Asii (i bioetanol v Číně)

mixed

- specifické silné belgické ales (refermentace v lahvích)
- chleba



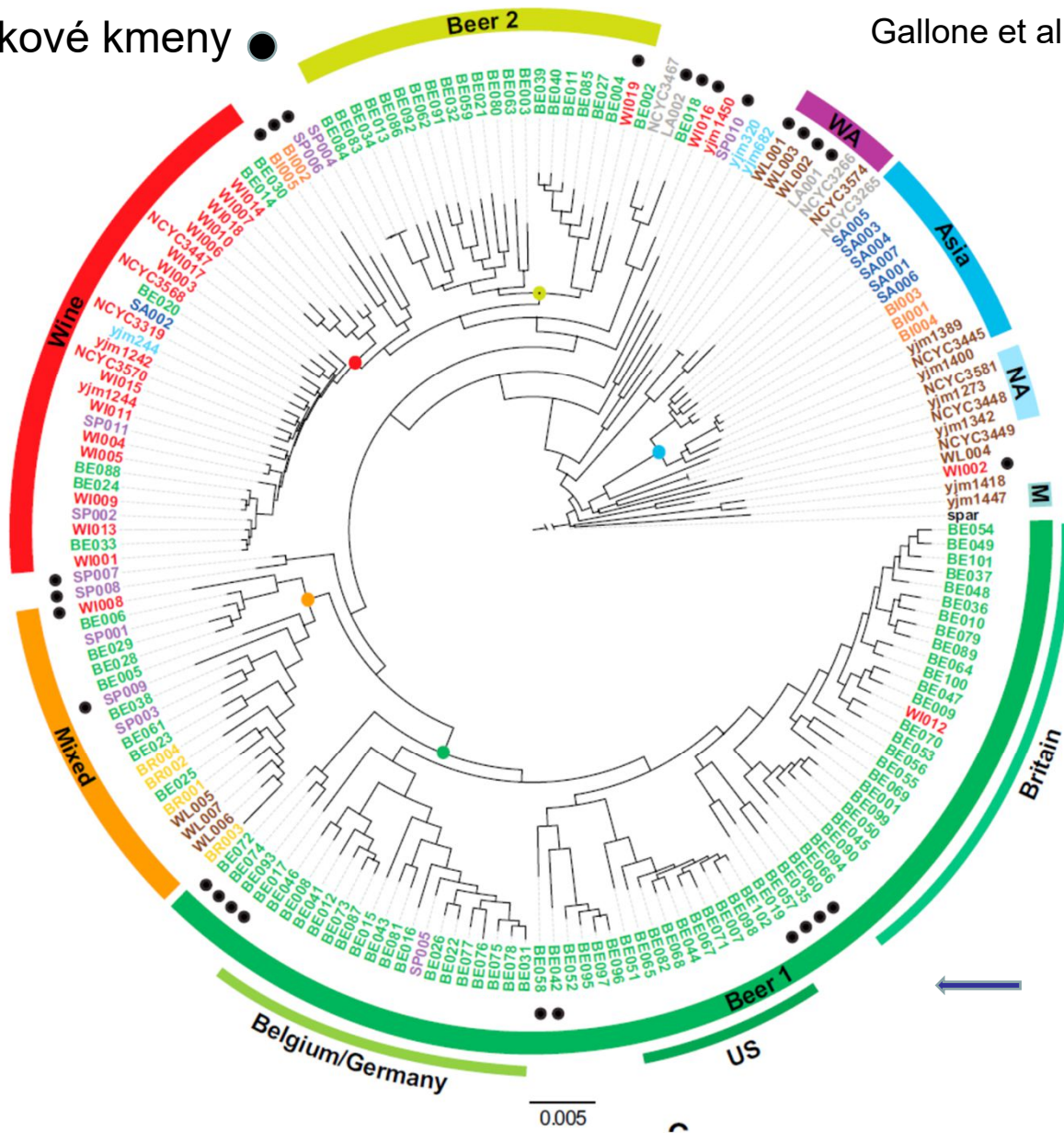
Mosaikové kmeny

Gallone et al, Cell, 2016

- Origin
- Beer
 - Wine
 - Spirits
 - Saké
 - Wild
 - Bio-ethanol
 - Bread
 - Laboratory
 - Clinical
 - S.paradoxus*

Lineage

- Beer 1
- Britain
- US
- Belgium/Germany
- Mixed
- Wine
- Beer 2
- West Africa (WA)
- Asia
- North America (NA)
- Malaysia (M)
- Mosaic



spirits – netvoří jednu linii (nepoužívají se opakovaně – není selektivní tlak – moderní technologie)

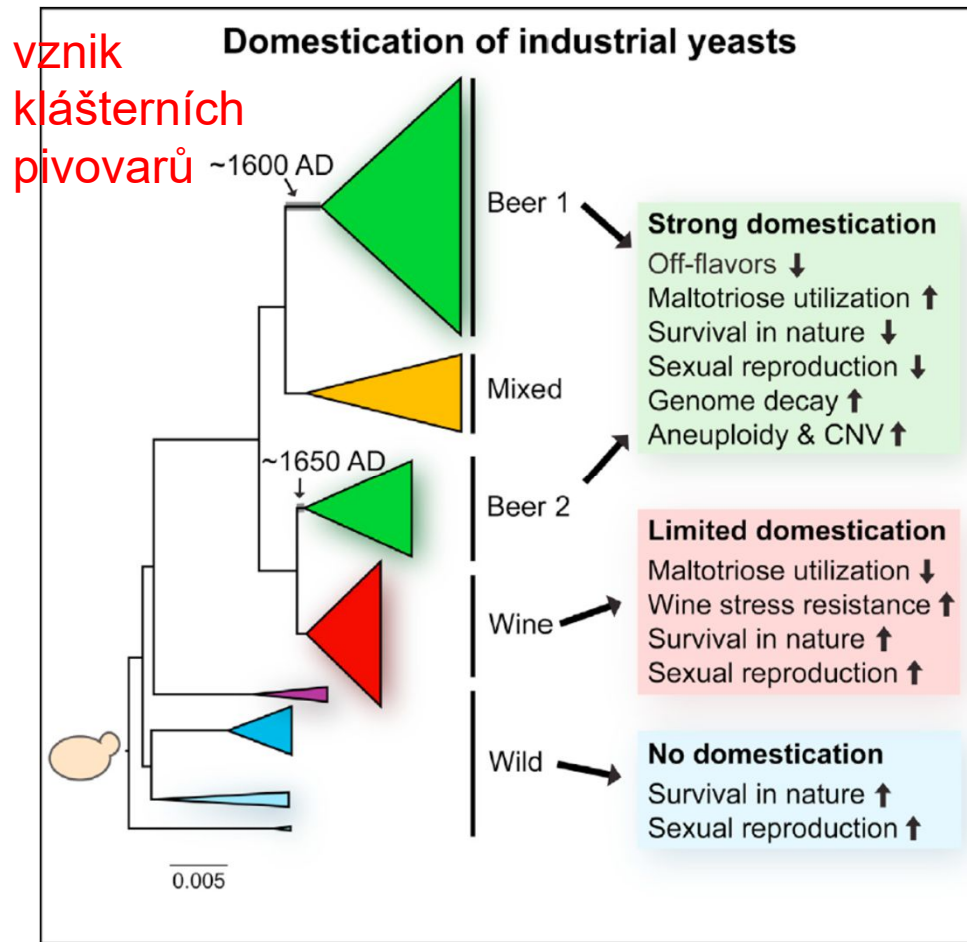
← *S. paradoxus* outgroup

← americké pivo má kořeny v Británii

• **pivo 1 a 2 - nové pivní linie** (evolučně izolované — 2 domestikací události - linie 2 domestikace s vinnými kmeny) - (geny podílející se na C a N metabolismu, flokulaci ... mají nejvíce (CNV – copy number) variací)

analýza genomu a fenomu:

průmyslově-specifická selekce na toleranci ke stresu (vyšší obsah etanolu 7-15%), využití cukru, specifické aroma, nižší schopnost reprodukce

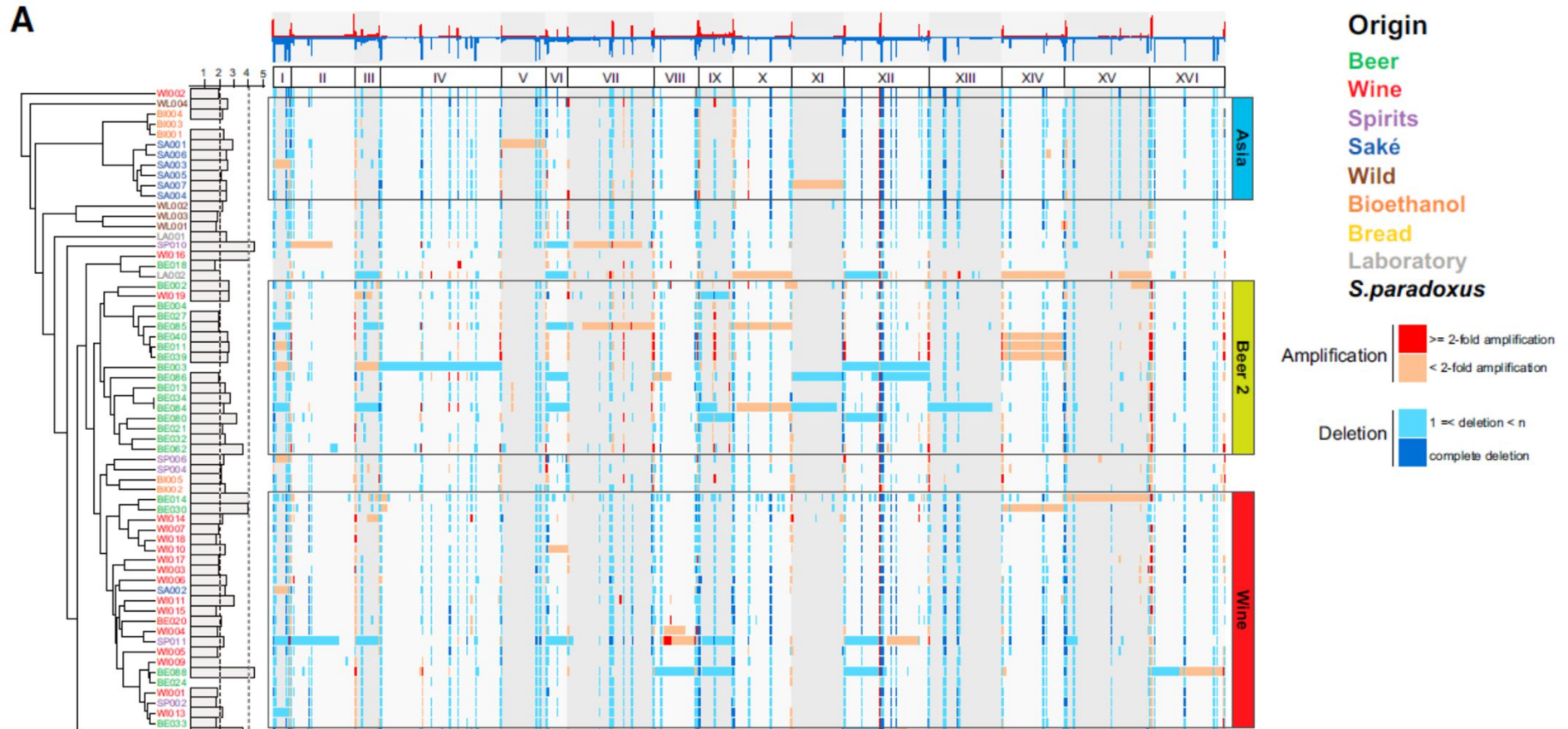


„očkovaním“ předchozích pivních kultur do nových kvasných procesů (ztráta kontaktu s přírodním prostředím - ~75 000 generací) – např. ztráta schopnosti sporulovat (stále bohaté médium), rychlejší evoluce ... nebo naopak zvýšení resistance vůči sulfátům (přidávaným kvůli konzervaci)

mutace a duplikace v MAL genech – zlepšení schopnosti utilizace maltosy

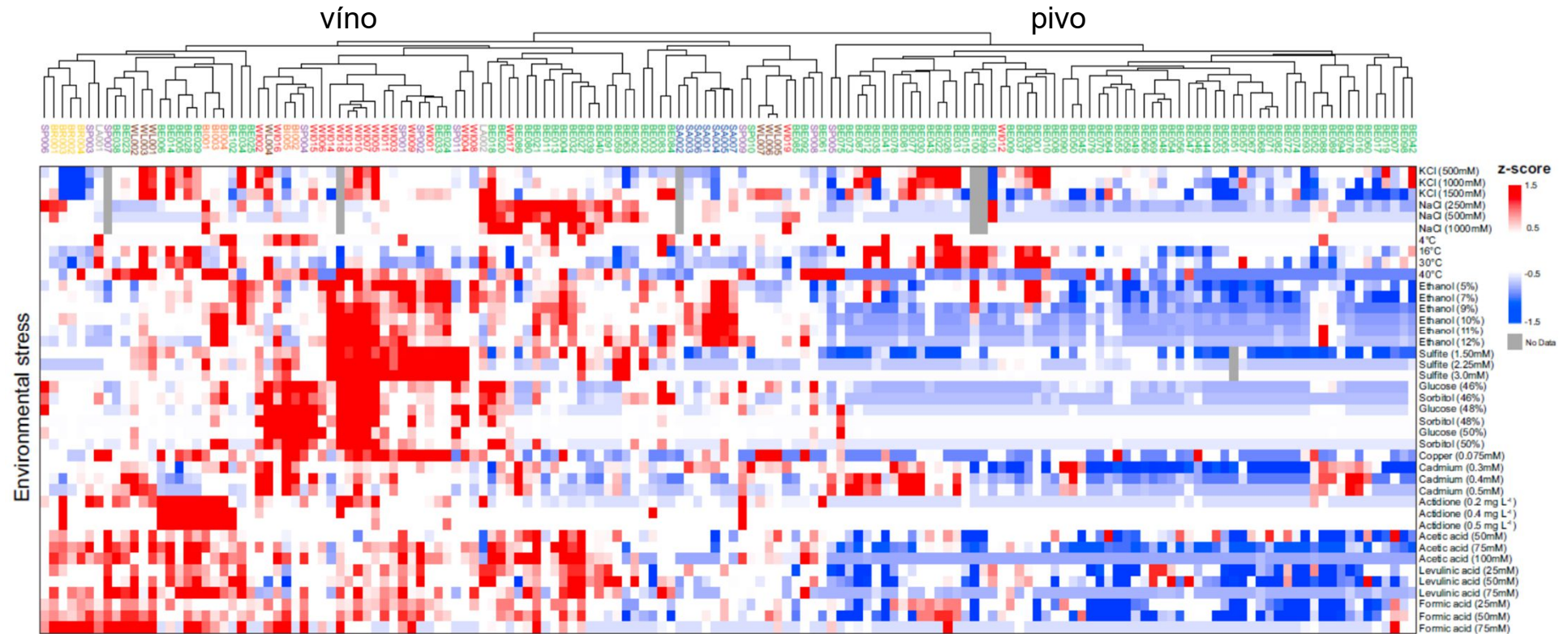
- nonsense mutace PAD1 a FDC1 (snížení produkce 4-vinyl guaiacolu odpovídajícího za nepříjemné aroma piva) ...

analýza genomu



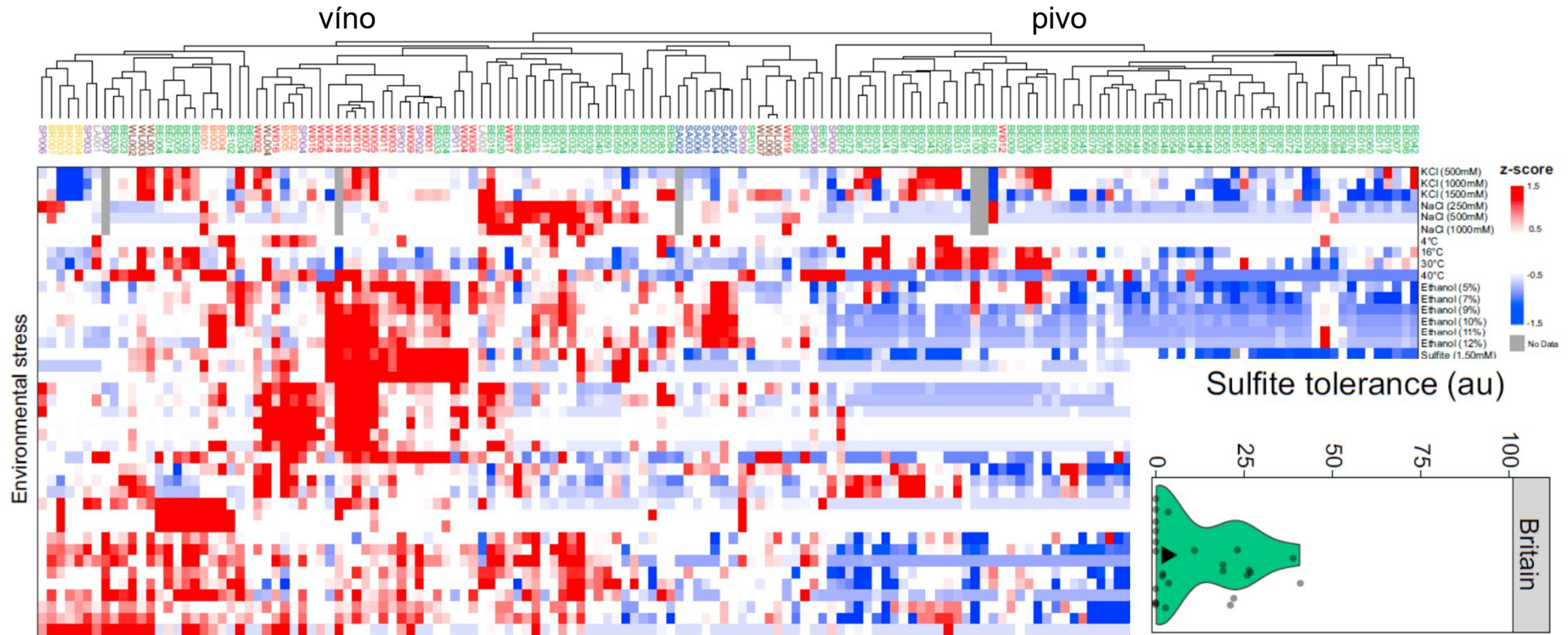
nejvíce amplifikací v MAL genech (IMA2, IMA3, MAL31, MAL33, MAL32) u pivních kvasinek (rostou na maltose), zatímco ve vinných kmenech došlo k mnoha delecím těchto genů (ve vinném moštu maltosa není) – obecně více delecí než amplifikací (v genomech analyzovaných kvasinek)

analýza fenomu

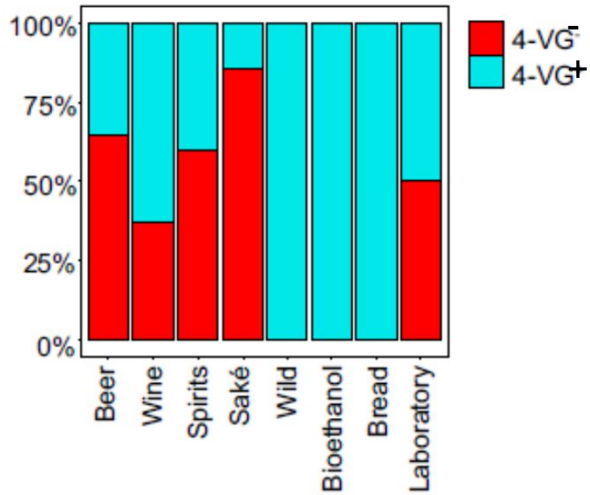


hierarchické členění výsledků analýzy fenotypu (fenomu) – určitá korelace s genomem ... - pivní linie (beer1) nejsou příliš odolné vůči stresu (nejsou mu vystaveny v pivovarech), zatímco vinné kvasinky jsou velice odolné (kvasné prostředí je bohaté na cukry a vyšší koncentrace alkoholu – hladina cukrů se v různých sezónách liší ... mimo sezonu přežívají v „přírodním“ prostředí – musí být adaptabilnější než pivní)

analýza fenomu

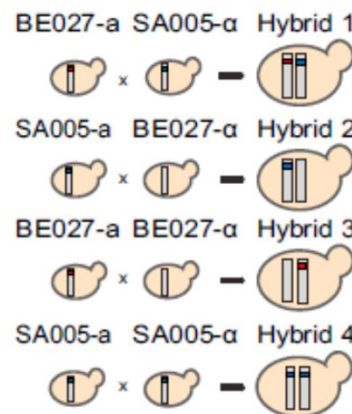
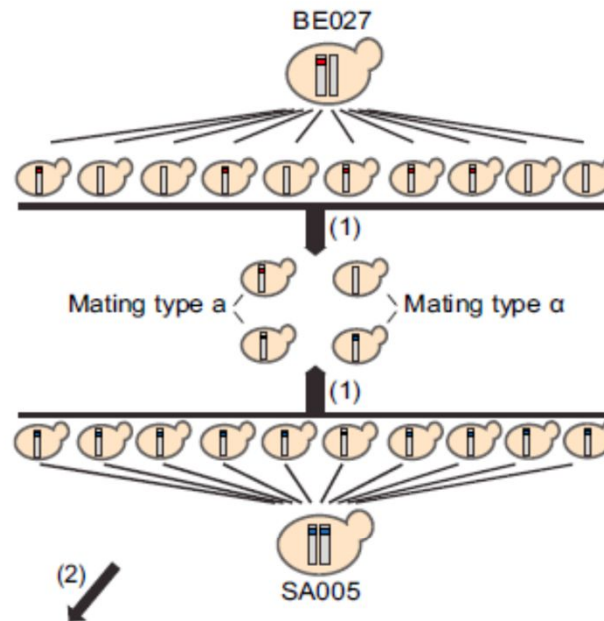


hierarchické členění výsledků analýzy fenotypu (fenomu) – určitá korelace s genomem ... - pivní linie (beer1) nejsou příliš odolné vůči stresu (nejsou mu vystaveny v pivovarech), zatímco vinné kvasinky jsou velice odolné ... zvýšení resistance vůči sulfátům (přidávaným kvůli konzervaci)

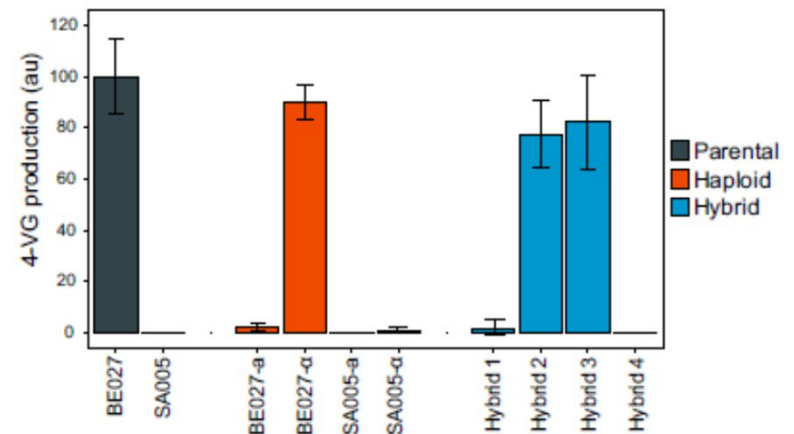


- divoké typy chrání před rostlinnými toxiny
- při pečení chleba jsou tyto látky zničeny
- pивní kmeny - nonsense mutace PAD1 a FDC1 (snížení produkce 4-vinyl guaiacolu odpovídajícího za nežádoucí aroma piva)

- křížily pивní kmen schopný produkce 4-vinyl guaiacolu s kmenem pro výrobu saké (vysoká produkce alkoholu)
- pивní produkt se specifickým aroma a vysokým obsahem alkoholu

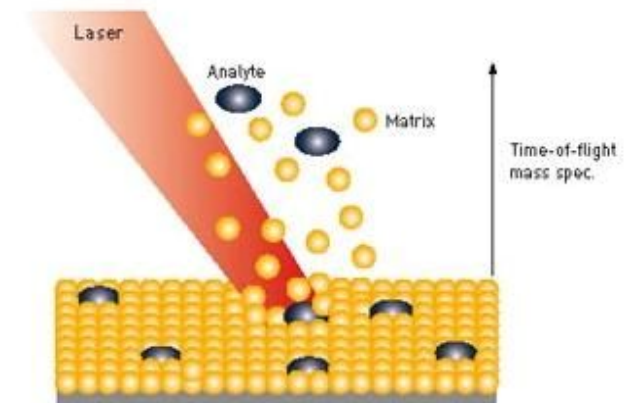
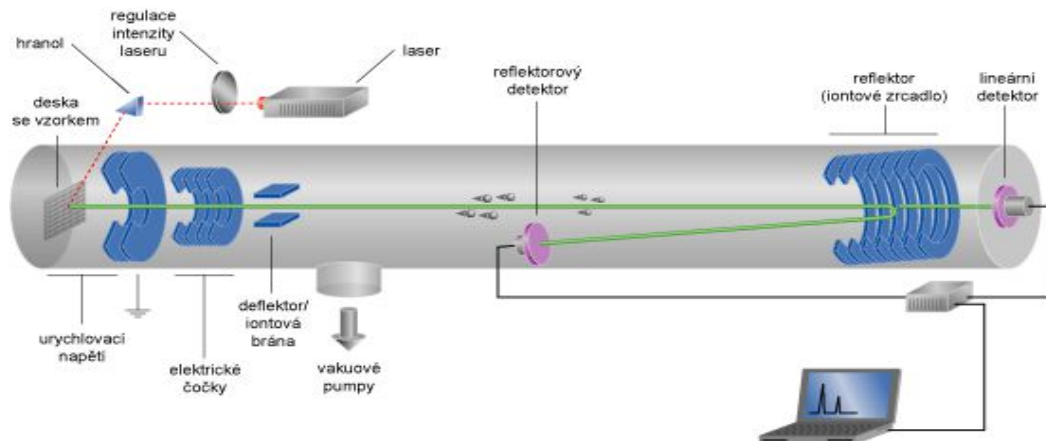


(3)



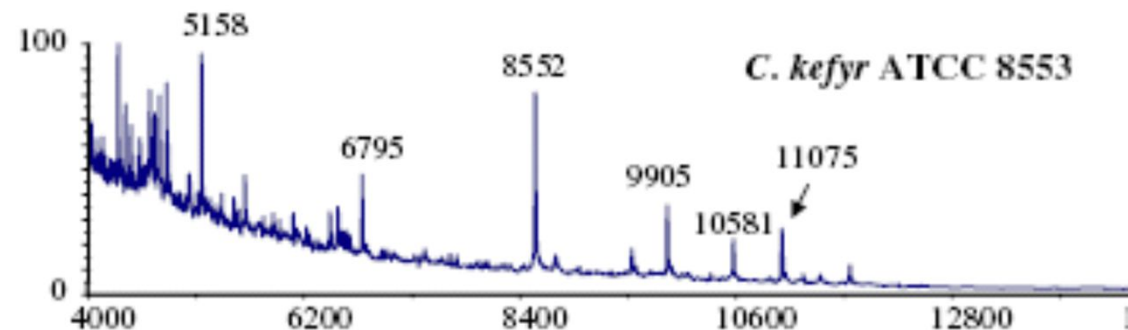
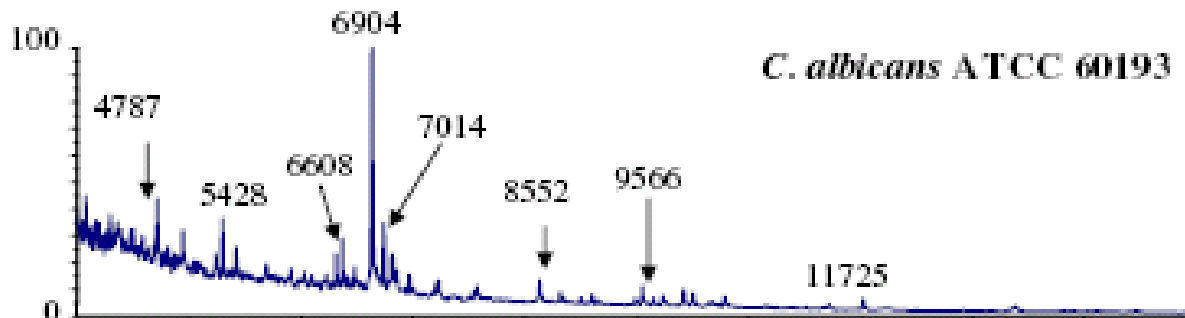
MALDI-TOF

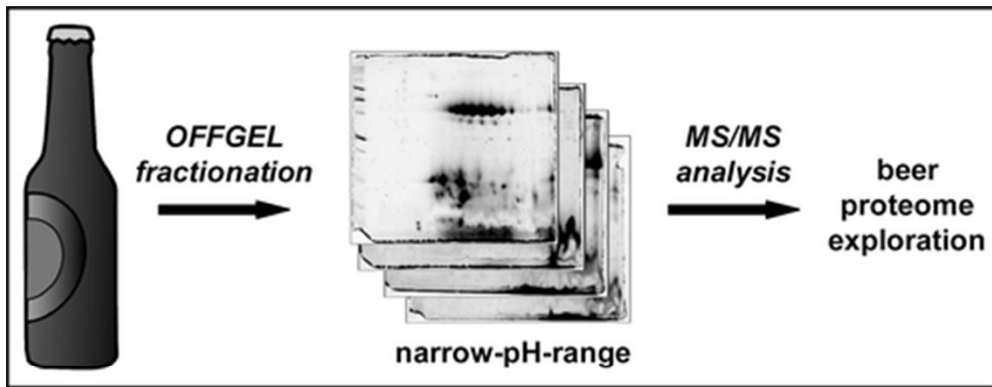
- hmotnostní spektrometrie s laserovou desorpcí a ionizací za účasti matrice s průletovým analyzátozem (matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry– MALDI-TOF)
- Umožňuje odpaření a ionizaci netěkavých biologických vzorků z pevné fáze přímo do plynné
- Vzorek je smíchan s tzv. matricí, 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 vakuua v trubici detektoru - z jeho pohybu vakuovaným prostorem lze vypočítat poměr jeho hmotnosti a náboje (z doby letu částice)



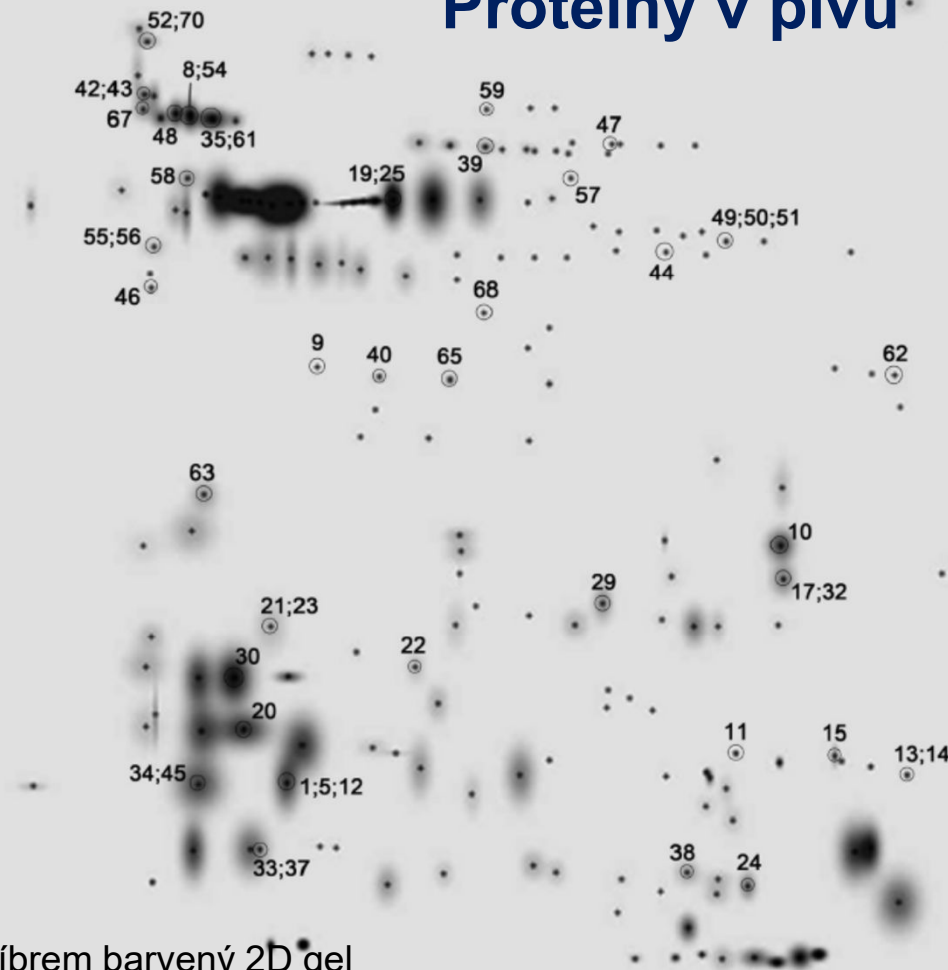
MALDI-TOF

- 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





Proteiny v pivu

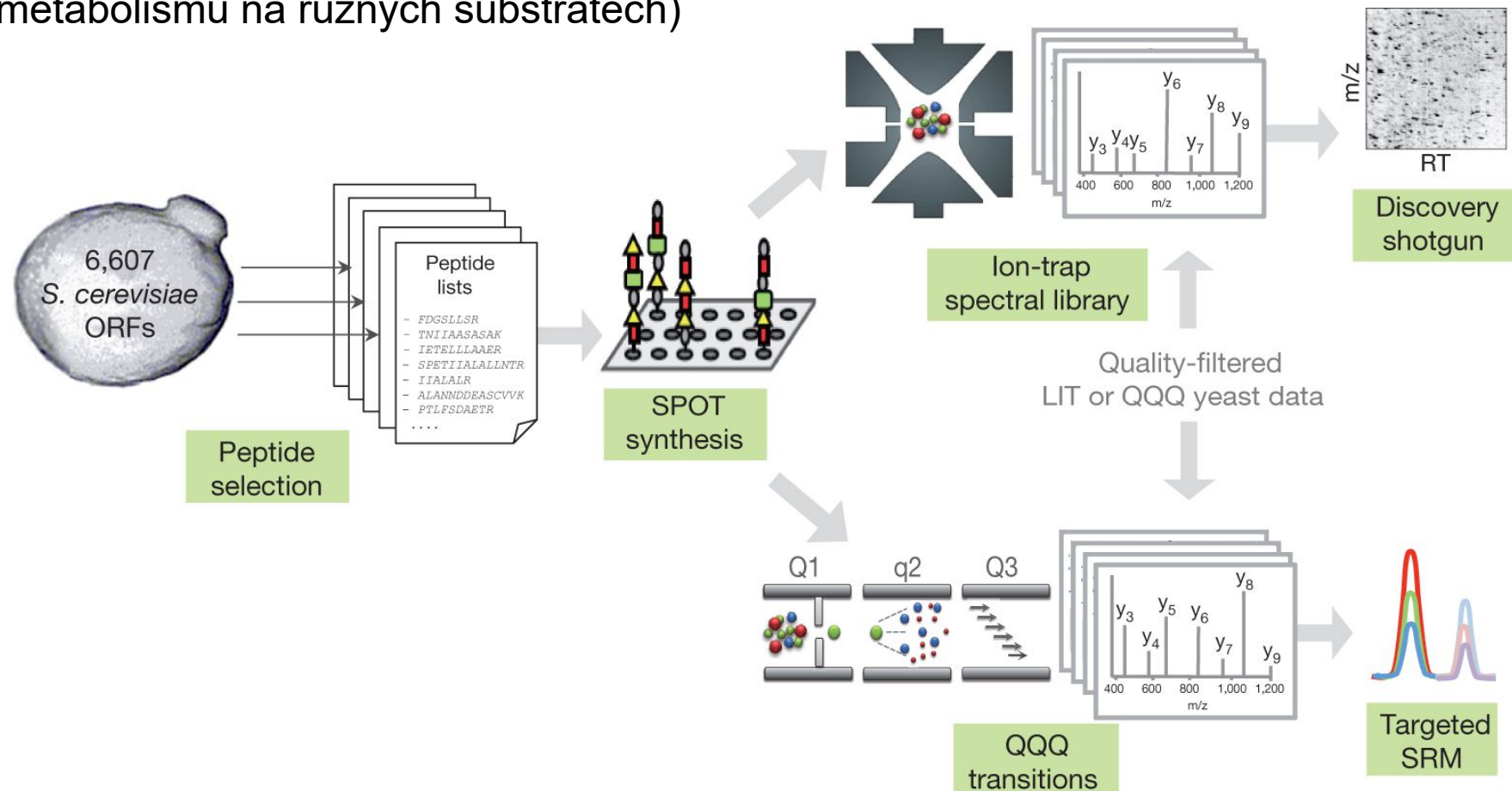


Stříbrem barvený 2D gel

no.	GI no.	protein name	score	pept
<i>Saccharomyces</i> species				
39	gil6321968	2-phosphoglycerate dehydratase	1583	13
40	gil10383781	3-phosphoglycerate kinase	838	10
41	gil48428723	acyl-CoA-binding protein 2	72	3
42	gil6323964	cell wall protein, Scw10p	644	8
43	gil6321718	cell wall protein, Scw4p	298	7
44	gil6320249	coproporphyrinogen III oxidase	105	5
45	gil6321648	cytoplasmic thioredoxin isoenzyme	369	7
46	gil6321721	endo- β -1,3-glucanase	797	7
47	gil171455	enolase	1542	15
48 ^b	gil46395590	glucan 1,3- β -glucosidase	90	1
49 ^b	gil219564313	glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase	1111	13
50	gil219564301	glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase	1190	14
51	gil6322409	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, isozyme 1	708	8
52	gil3730	glycolipid-anchored surface protein	195	8
53	gil349747	heat shock protein of HSP70 family	88	2
54	gil6323331	major exo-1,3- β -glucanase	491	9
55	gil6322303	mannose-containing glycoprotein	75	4
56	gil968906	NCA3	299	5
57 ^b	gil6321973	Oye2p	82	1
58	gil6325103	Pep4p	80	4
59	gil6319673	Pgi1p	446	4
60 ^b	gil6324696	profilin	86	4
61 ^b	gil6322382	Pry1p	70	1
62	gil6322697	tetrameric phosphoglycerate mutase	519	9
63	gil6323138	thioredoxin peroxidase	757	4
64 ^b	gil6319638	Tos1p	132	1

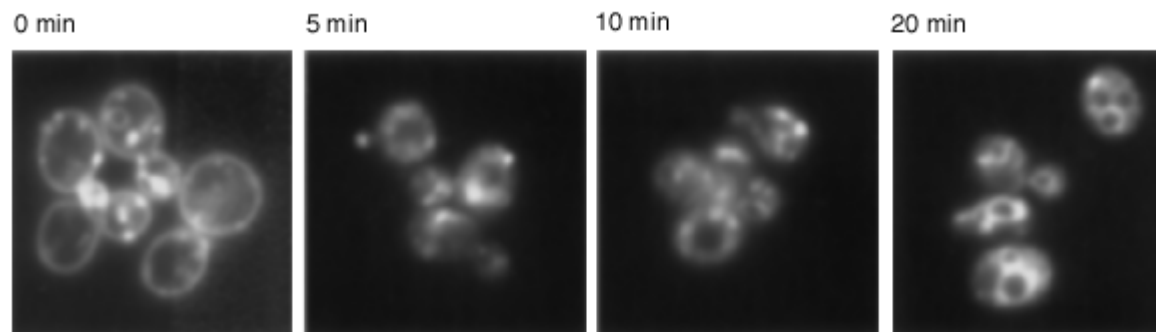
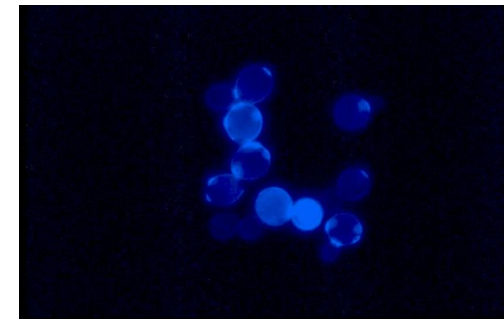
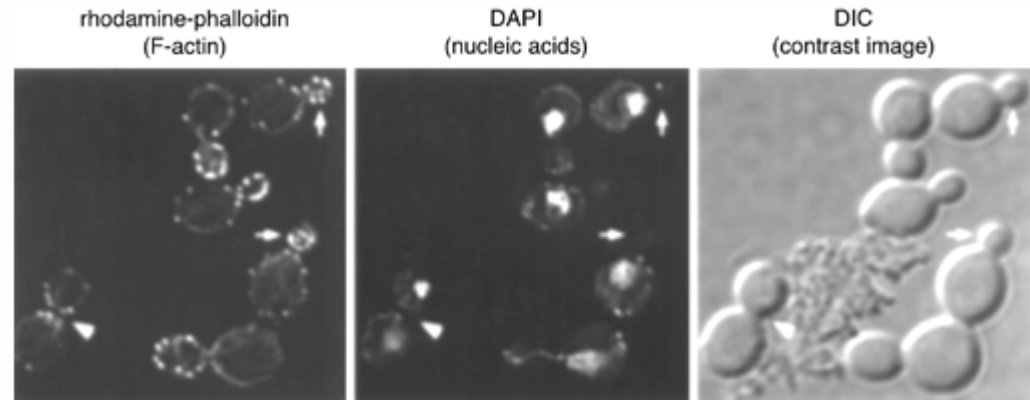
MALDI-TOF

Vygenerování referenční „mass-spectrometric“ mapy pro kvasinkový proteom
Tak jako se sekvenoval kvasinkový genom (první eukar.), tak se „sekvenuje“ proteom – slouží ke sledování exprese/přítomnosti proteinů v kvasinkové buňce za různých podmínek/situací (např. změny proteomu v průběhu buněčného cyklu, změny metabolismu na různých substrátech)

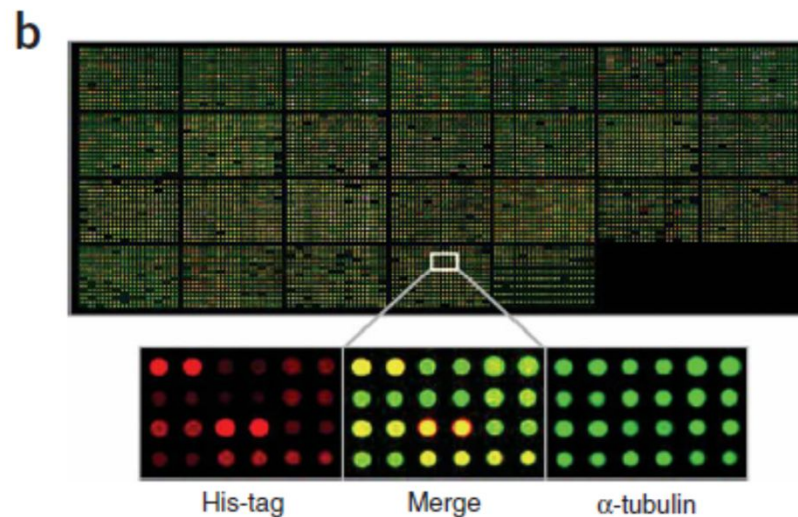
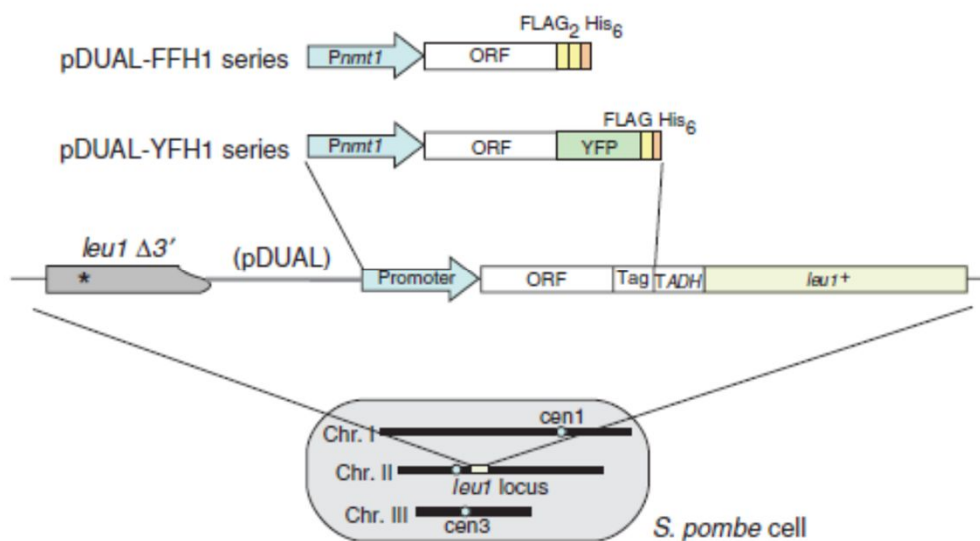


... metody studia – fluorescenční ...

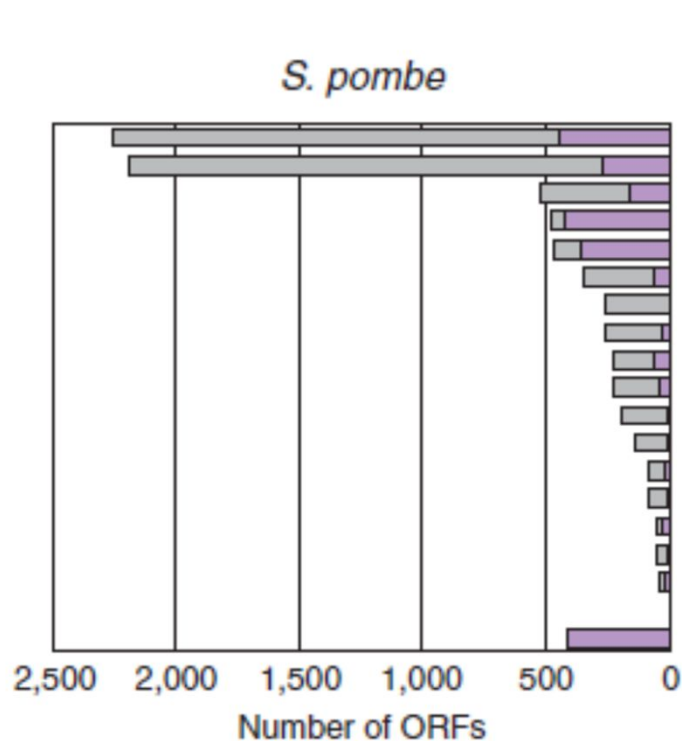
- Techniky barvení
 - FISH – lokalizace spec. sondy
 - DNA/jádro – **DAPI**
(4',6-diamidin-2-fenylindol)
 - aktinový – **phalloidin**
 - buněčná stěna – **calcofluor**
 - Endocytóza ->vakuoly – **FM4-64**
 - Mitochondrie, ER - **DiOC₆**
(3,3'-dihexyloxacarboyanine iodide)



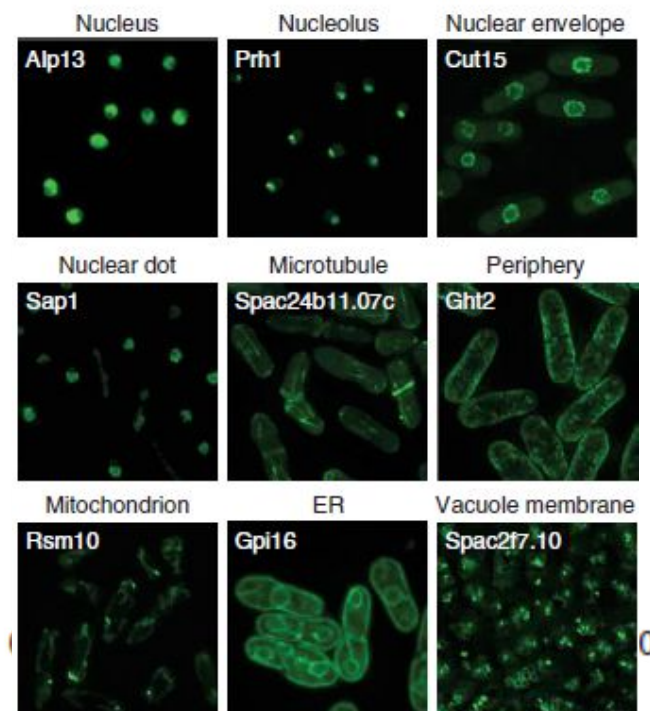
- proteiny tagované GFP (*in vivo*)

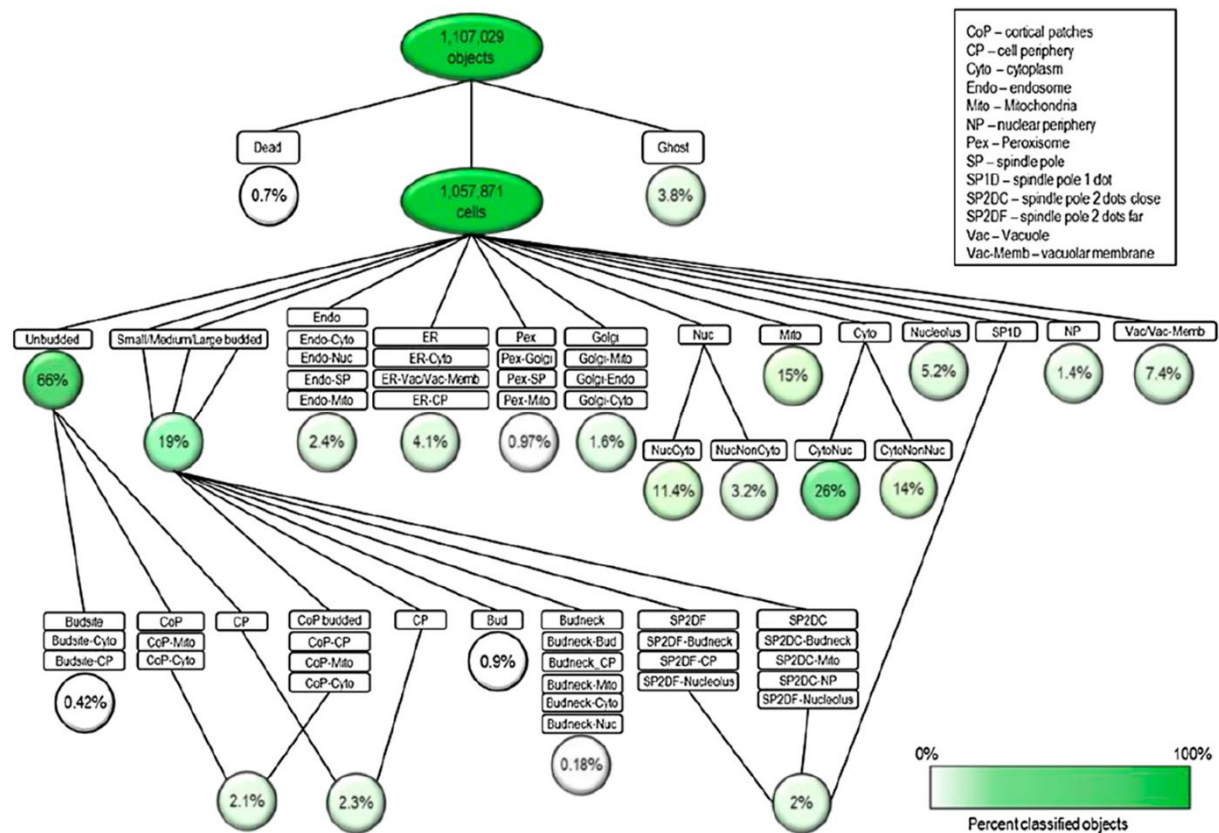
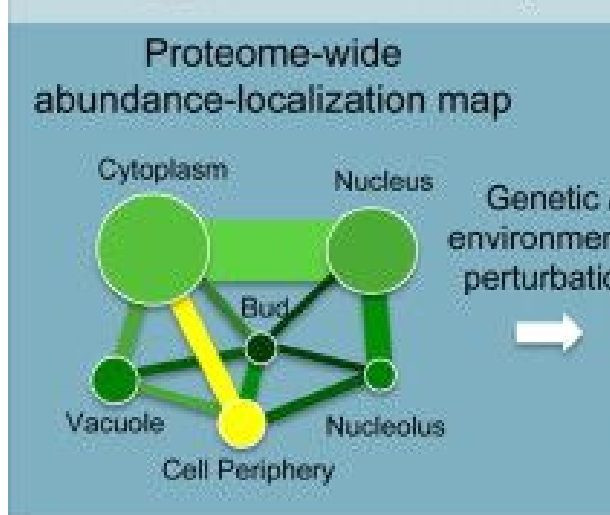
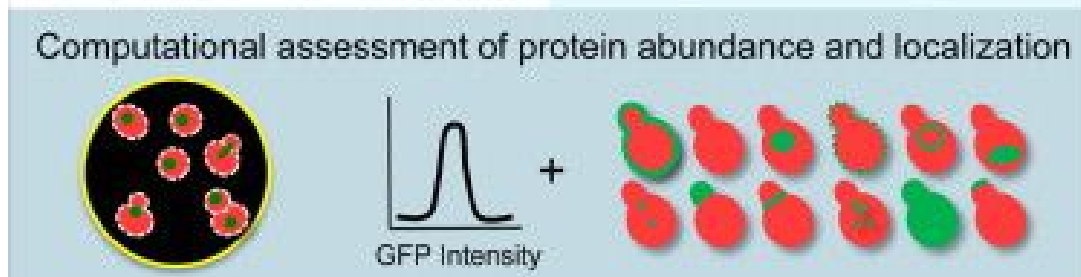
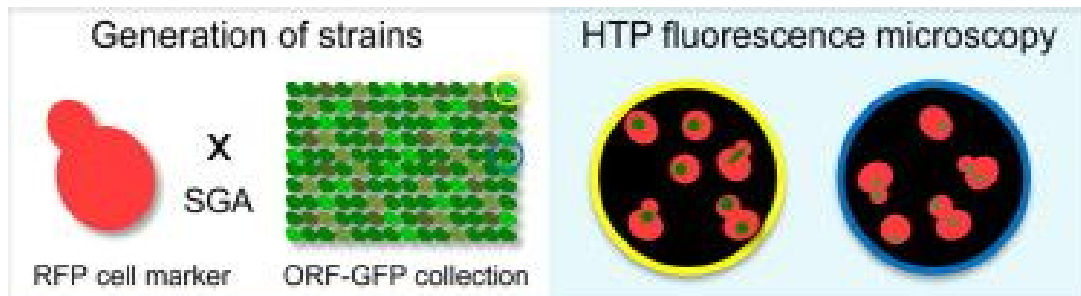


Určení lokalizace



- Categories
- This study/Yeast study
- Cytosol/cytoplasm
 - Nucleus
 - Cytoplasmic dot/punctate
 - Mitochondrion
 - ER
 - Periphery
 - Septum/bud neck
 - Nuclear dot
 - Golgi
 - Nucleolus
 - SPB
 - Cell tip
 - Nuclear envelope/nuclear periphery
 - Microtubule
 - Ambiguous
 - Vacuole membrane
 - Vacuole
 - Endosome
 - No apparent signal





Chong et al., Cell, 2015

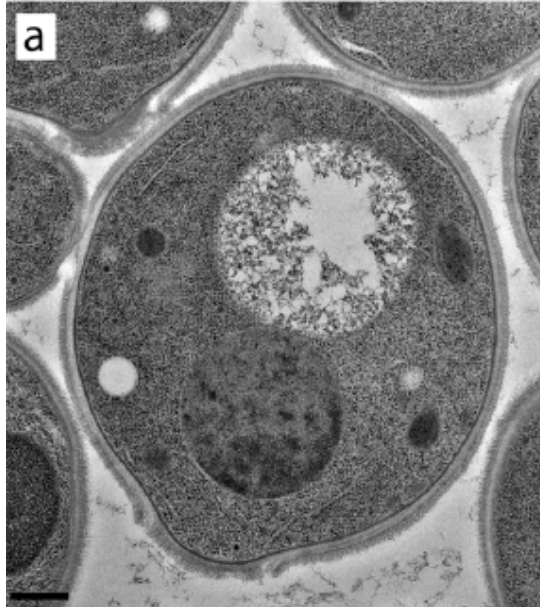
Koh et al., G3, 2015

<http://cyclops.ccb.utoronto.ca/>

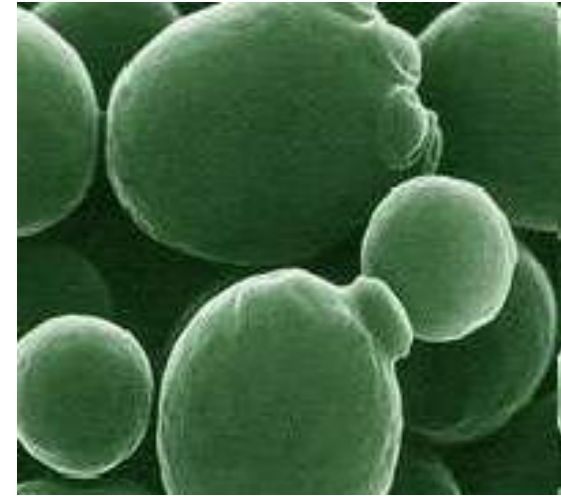
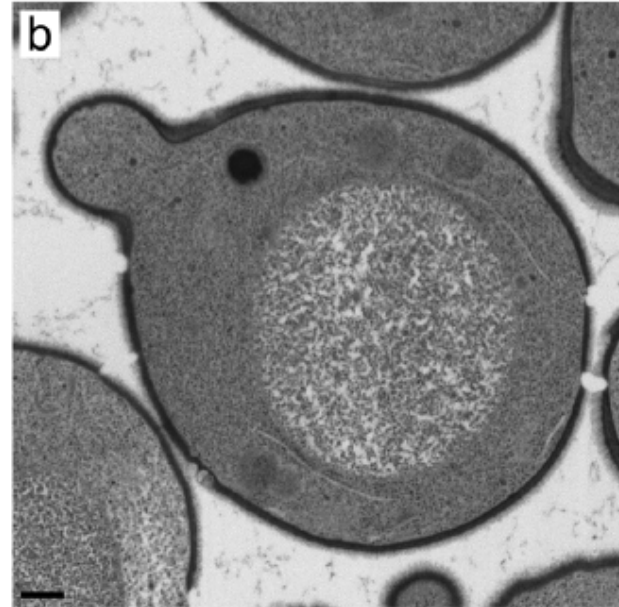
Elektronová mikroskopie

Wei, et al., BioTechniques, 2012

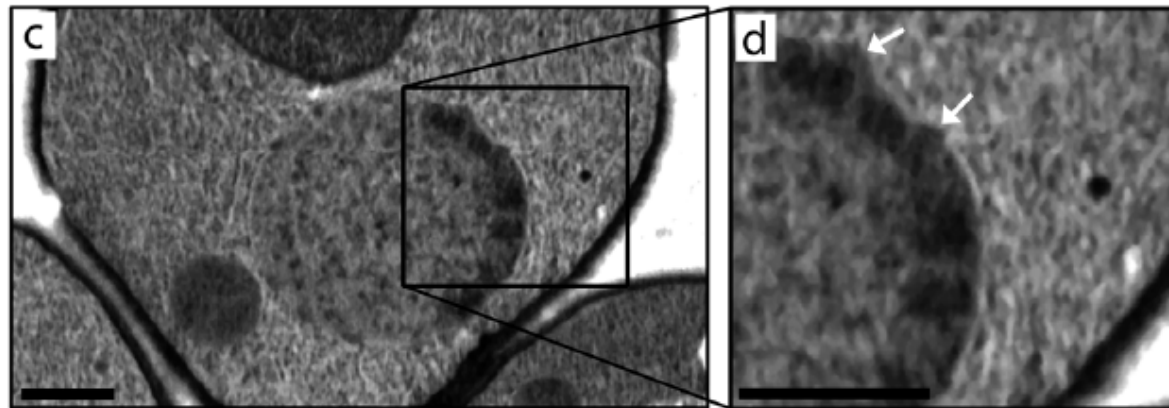
TEM



FIB - SEM



- studium buněčné stěny
... organel (sekrece ...)
více prof. Svoboda



- šipky ukazují na jaderné
póry

- vzorek „prosáknut“
epoxypryskyřicí a osmiem
- „focused-ion beam
scanning“ po 3nm

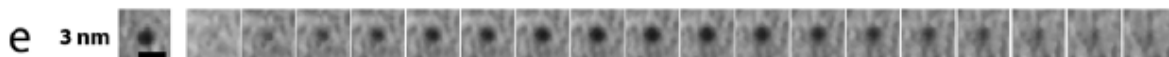
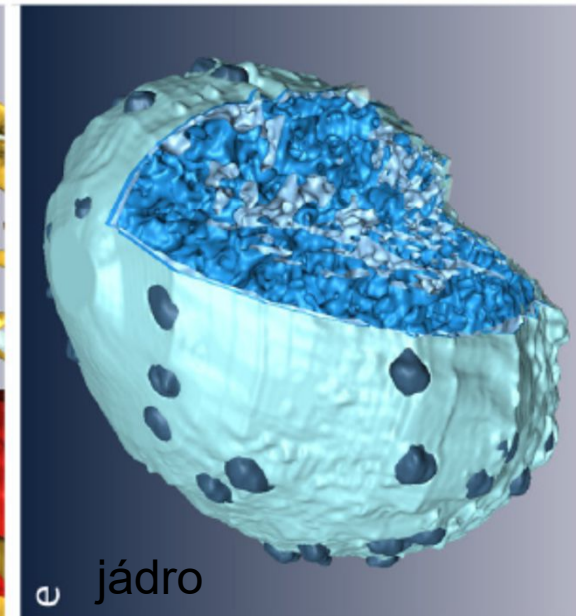
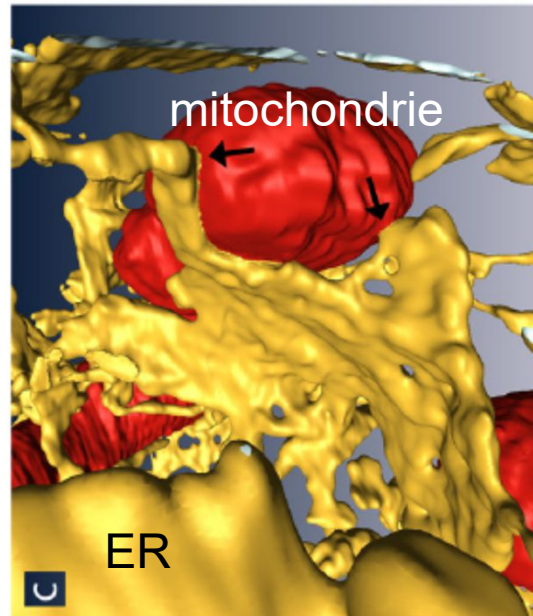
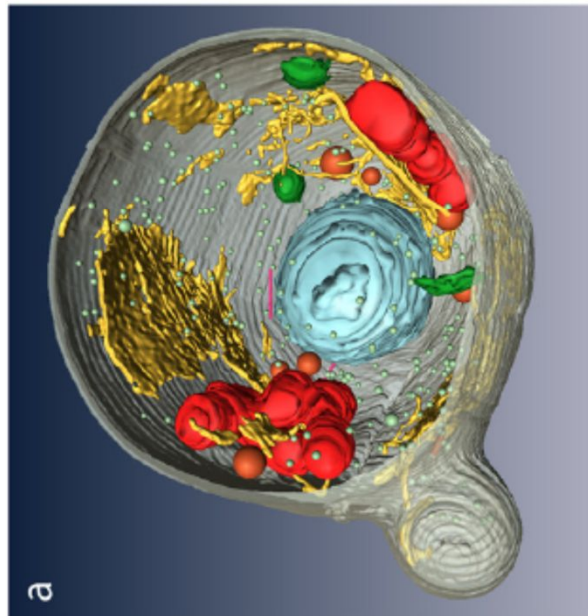
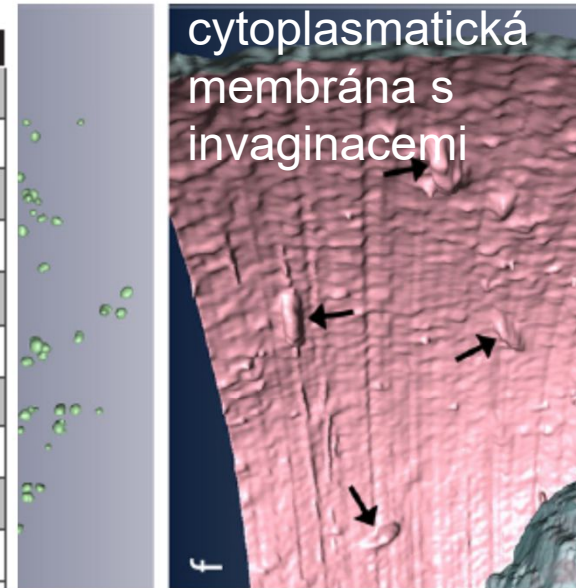


Table 1. Quantitative Analysis of Cellular Components.

Cellular component	Volume (μm^3)	Volume Percentage	Surface Area (μm^2)
Endoplasmic reticulum	0.420643	2.2%	31.403
Nuclear envelope	0.227859	1.2%	11.416
Heterochromatin	0.577432	3.0%	24.441
Euchromatin	0.459362	2.4%	20.716
Golgi	0.022677	0.1%	1.291
Mitochondria	0.299339	1.6%	6.949
Lipid droplets	0.139214	0.7%	2.692
Vesicles	0.000256	0.0%	0.025
Vacuoles	1.480174	7.8%	27.164
Cell Wall	3.017192	15.9%	67.115

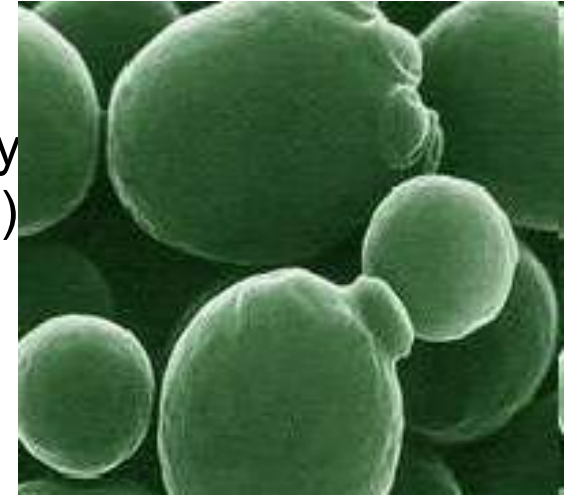


Wei, et al., BioTechniques, 2012

http://www.biotechniques.com/multimedia/archive/00182/Cyzmmek_Supplementa_182027a.mpg

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 (chr XII), 262 tRNA
- Geny reprezentují 75% celkové sekvence (kompaktní)
- <5% genů obsahuje introny (0.5% genomu), 3% transposony (46% u člověka)

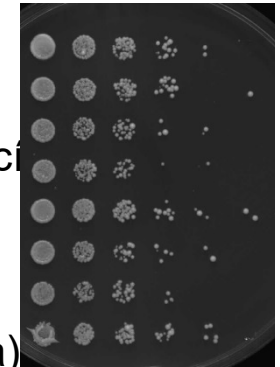


Schizosaccharomyces pombe

- podlouhlé, množí se „polcením“ - většinou haploidní buňky
- má blíž k vyšším eukaryotům (metazoa)
- pouze 3 kondenzované chromozomy (13 Mbp)
- velké repetitivní centromery (40-100kb) a 1kb počátky replikace
- tvorba spindlu až v mitóze
- asi 4800 kodujících genů (nejméně u eukaryot)
- z nichž 43% má introny
- má geny pro heterochromatin, RNA interferenci (S.c. nemá)
- 50 genů má homologie s geny lidských nemocí



Výhody kvasinkového modelu



- Rychle se množící **EUKARYOTNÍ** mikroorganismy (90 min/dělení, 25-30°C)
- Vytváří kolonie na plotnách - mikrobiologické metody (otiskování ploten, kapkovací 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 (např. aktinový cytoskelet = phalloidin, buněčná stěna = **calcofluor** + **GFP in vivo**)
- ...
- Techniky synchronizace buněk
- *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
- 6. FP – „3D Repertoire“ konsorcium (<http://www.3drepertoire.org>) -strukturu všech 800 komplexů *S. cerevisiae*
- Řada životních dějů má analogii v procesech v savčích buňkách (lidské geny testovány v kvasinkách - nemoci, metabolismus, regulační mechanismy)

