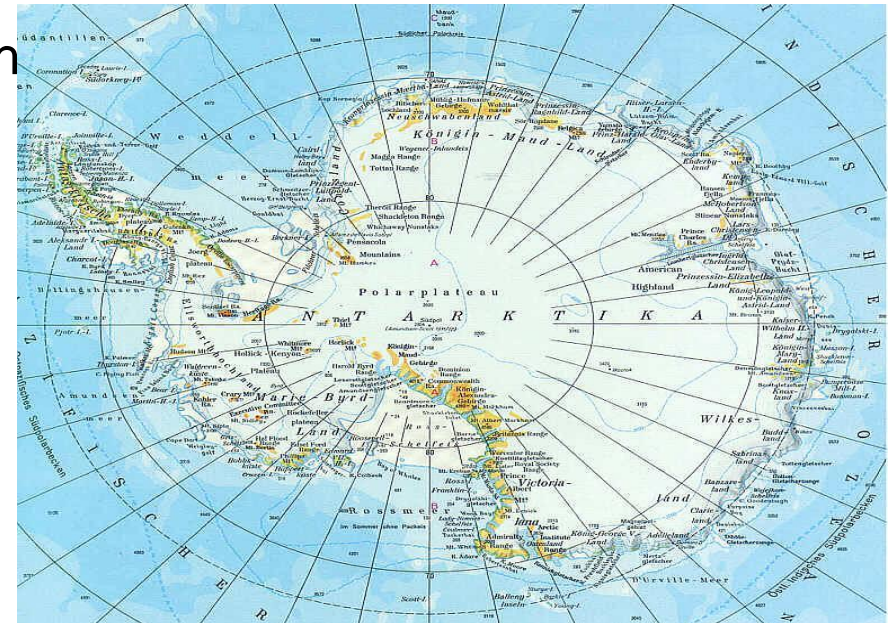


# Osnova 3. p ednázky

- “ Diagnostické metody
- “ Analytické metody
- “ Kvasinkové modelové organismy

Ur ení (nových) kmen v nových lokalitách



Ur ení kmene v klinických izolátech (odlizení patogenních kmen *Candida* )



Kontrola istoty kmene pro biotechnologické procesy (*Saccharomyces cerevisiae* . pivo)

zpracování vzork :

- z p dy: promývání v destilované vod ě homogenizace ě t epa ka ě
- klinické vzorky: t ě lní tekutiny, st ě r nebo pomocí lepidiv ě pásky ě a pak vyšet ě í na Sabouraud ě v agar nebo jiné bohat ě médium kultivace 2-7 dn ě í teplot ě ch 22-42°C (37°C)

### Léka ě ská mykologie ě Bi3390

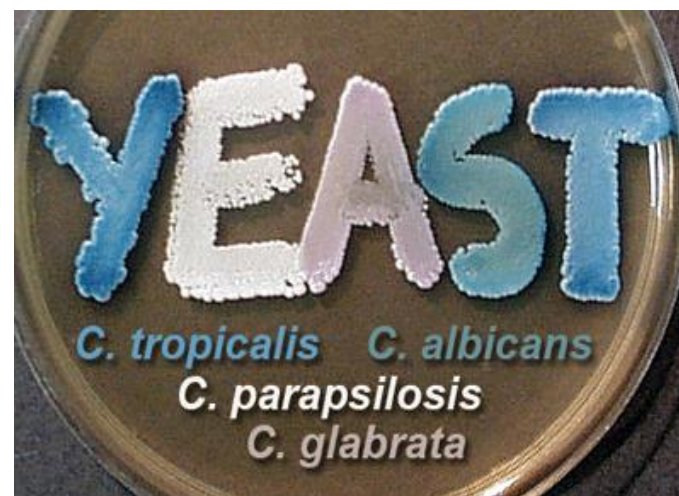


identifikace/analýza:

- fenotypové metody ě morfologie koloni ě í, morfologie bun ě k ( ě spor)
- biochemické vlastnosti (fermentace cukr ě , asimilace uhlíkat ě ch nebo dusíkat ě ch substr ě t ě ě r st na chromogenn ě ch plotn ě ch)

modern ě metody

- PCR (nested, multiplex, RFLP),
- sekvena ě ní (454 technologie),
- hmotnostn ě spektrometrie





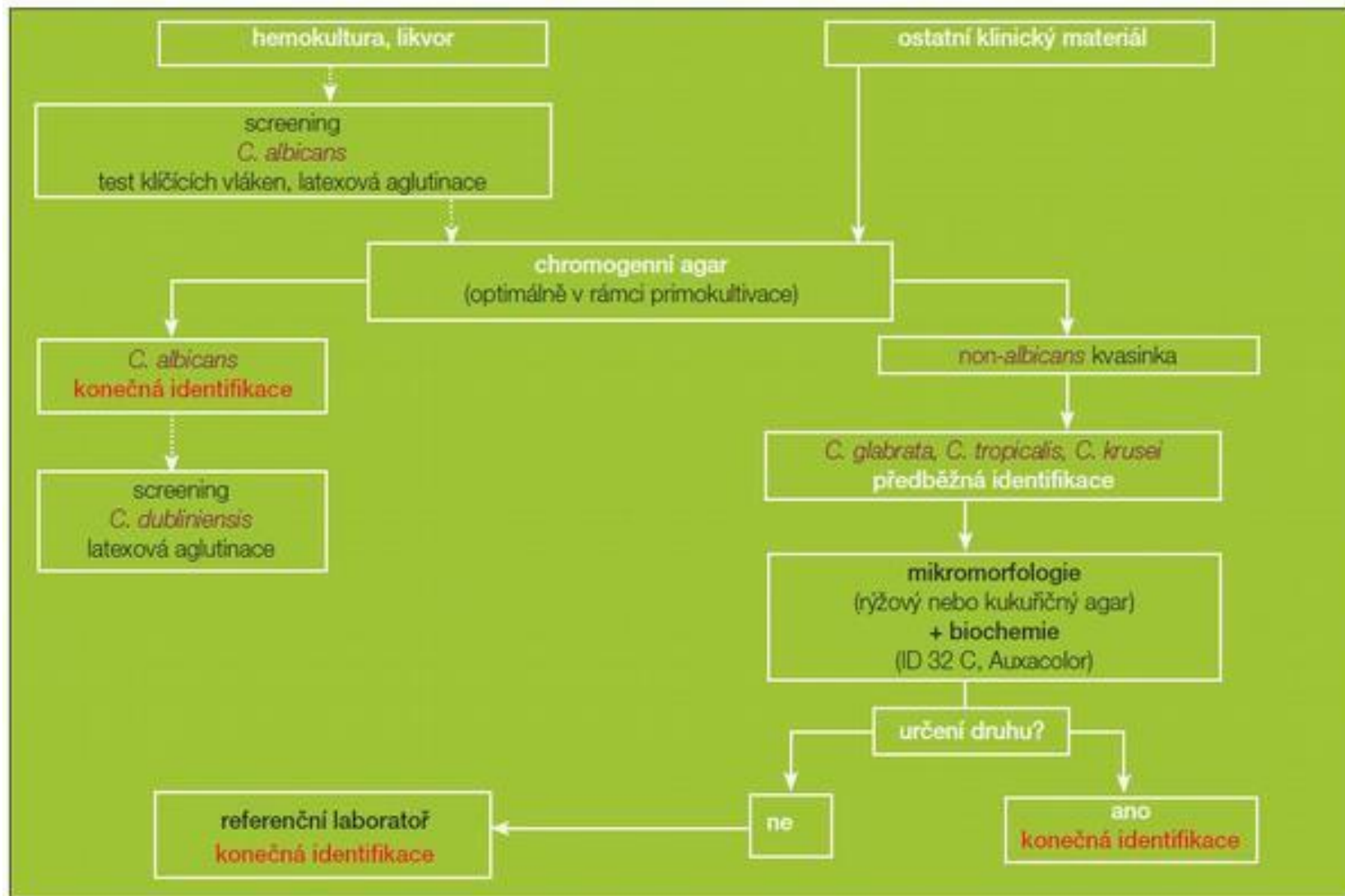
V klinické praxi je důležitá rychlost a přesnost (při zachování správné léčitelnosti)

**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	chlamydozpy artrospory mycelium/pseudomycelium
		barvený preparát	askospory pouzdra
	blochemie	asimilace	Intenzita zákalu barevná změna
		fermentace	produkce CO <sub>2</sub>
	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“

# Postup klinického vyšetření



# Fenotypové metody

Morfologie . rozlišení jednotlivých druhů dle tvaru, velikosti, kolonií, hyf, sporů teplotní testy.

- rozdělení dle způsobu pohlavního rozmnožování (asko-vecko, basidio-stopkovýtřusé a deuteromycetes; basidiosporogenní produkují ureasu . na močovíně s fenol ervením se barví červeně )

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

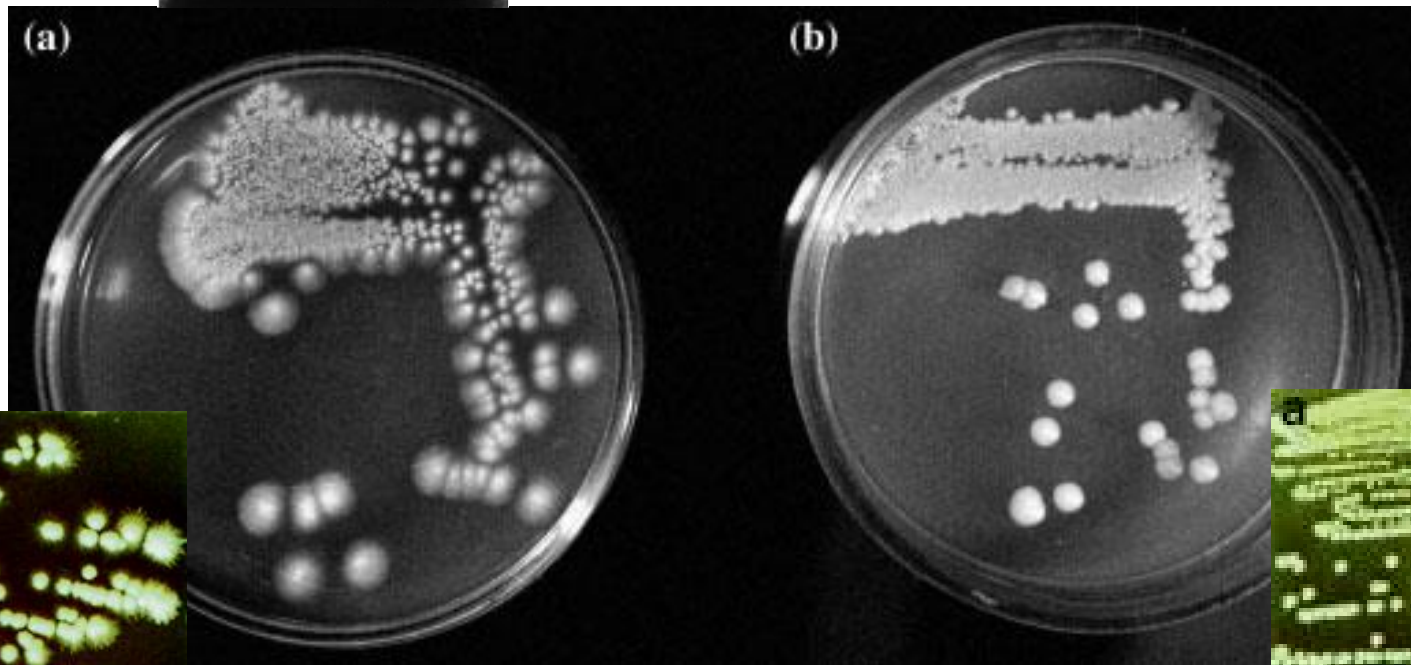
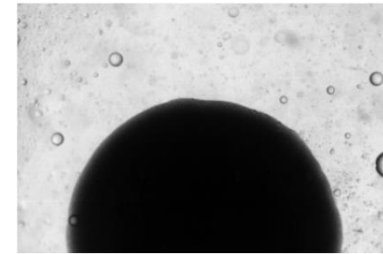
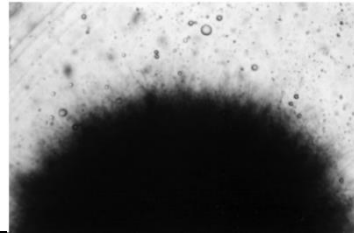


*C. dubliniensis*: nadbytek chlamydospor na koncích krátkých pseudohyf

- test klíčení hyf, *C. albicans* přímo z pozitivních hemokultur nebo kaseinový agar nebo kukurmičný agar

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*

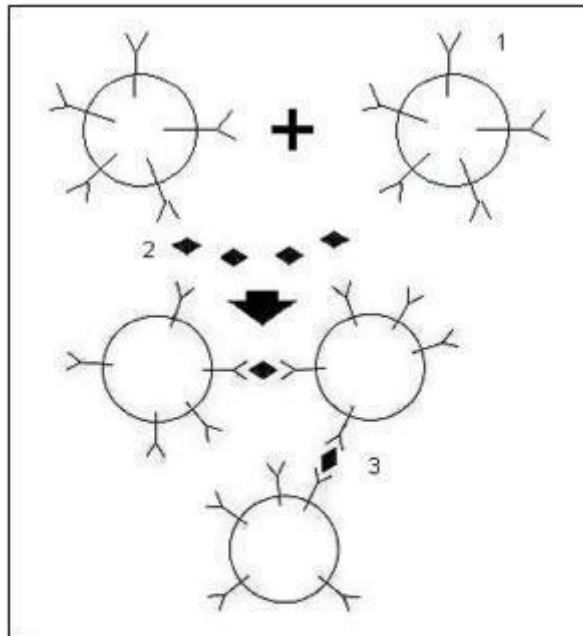


# Sérologické testy

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



Specifické protilátky proti antigenům buněčné stěny (omezené množství)



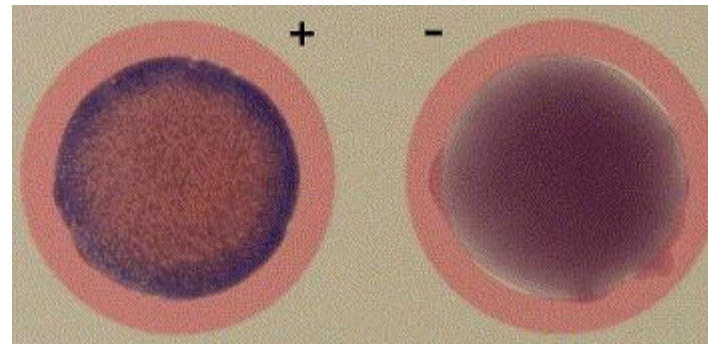
Obr. 2: 1 – latexová částice s navázanou specifickou protilátkou na povrchu; 2 – virová částice; 3 – shluk latexových částic s viry, který vytváří zákal ve vzorku

Toto platí pro kvasinky

## Latexová aglutinace

*C. dubliniensis*

*C. albicans*



## Teplotní test

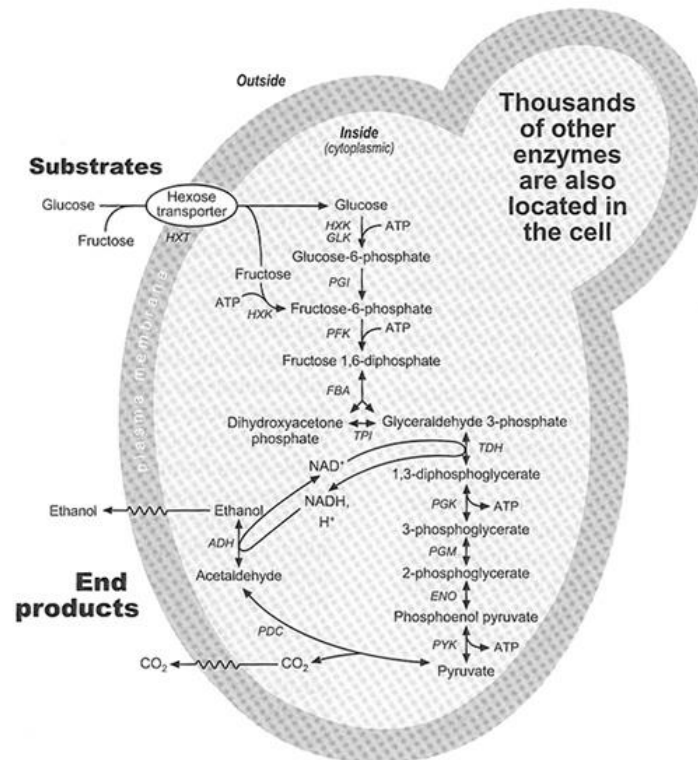
Phenotypic criteria	<i>C. albicans</i>	<i>C. dubliniensis</i>
Growth at 42 to 45°C	+	-
Growth on hypertonic Sabouraud broth	+	-



# Biochemické testy

- Biochemické parametry . založeny na schopnosti utilizace uhlíkatých látek (cukr ), 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 <sub>2</sub>



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-β-D-glukosid . chybí β-D-glukosidázová aktivita; *C. albicans* není schopna využít glycerol)

# Biochemická charakteristika

## “ Rhodotorula

- “ Ureáza +
- “ KNO<sub>3</sub> utilizace -
- “ Fermentace
  - . Mal, Lac, Sac, Glc .
- “ Asimilace sacharid
  - . Mal+ Sac+ Lac-
  - . **Raf+ Mlz+ (Raf- Mlz+)**
  - . **Xyl+ Ara+ (Xyl+ Ara-)**
  - . Inl- Aml-
  - . Cel+ Tre+

## “ Sporidiobolus

- “ Ureáza +
- “ KNO<sub>3</sub> utilizace .
- “ Fermentace
  - . Mal, Lac, Sac, Glc .
- “ Asimilace sacharid
  - . Mal- Sac+ Lac+ Raf+ Mlz+
  - . **Xyl+ Ara- (Xyl- Ara-)**
  - . **Inl- Aml+ (Inl- Aml-)**
  - . Cel+ Tre+

### YT MicroPlate™

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

FIGURE 1. Carbon Sources in YT MicroPlate



Oxidation Tests



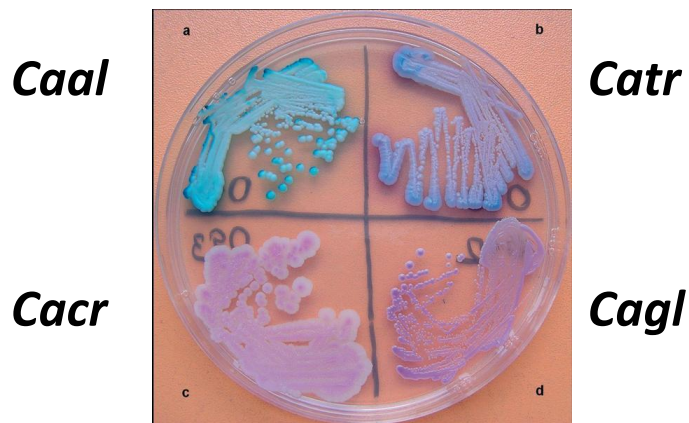
Assimilation Tests

Je možné určit a0 267 druh kvasinek z 53 rod (ale pouze 50% spolehlivost)



# Chromogenní testy

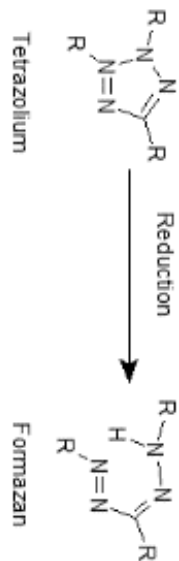
- test enzymových aktivit - chromogení substráty . nap . tetrazoliové soli
- „Zlatý standard“ – půda vyvinutá Rambachem - CHROMagar Candida (CHROMagar Microbiology, v ČR Colorex Candida od Trios)



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



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



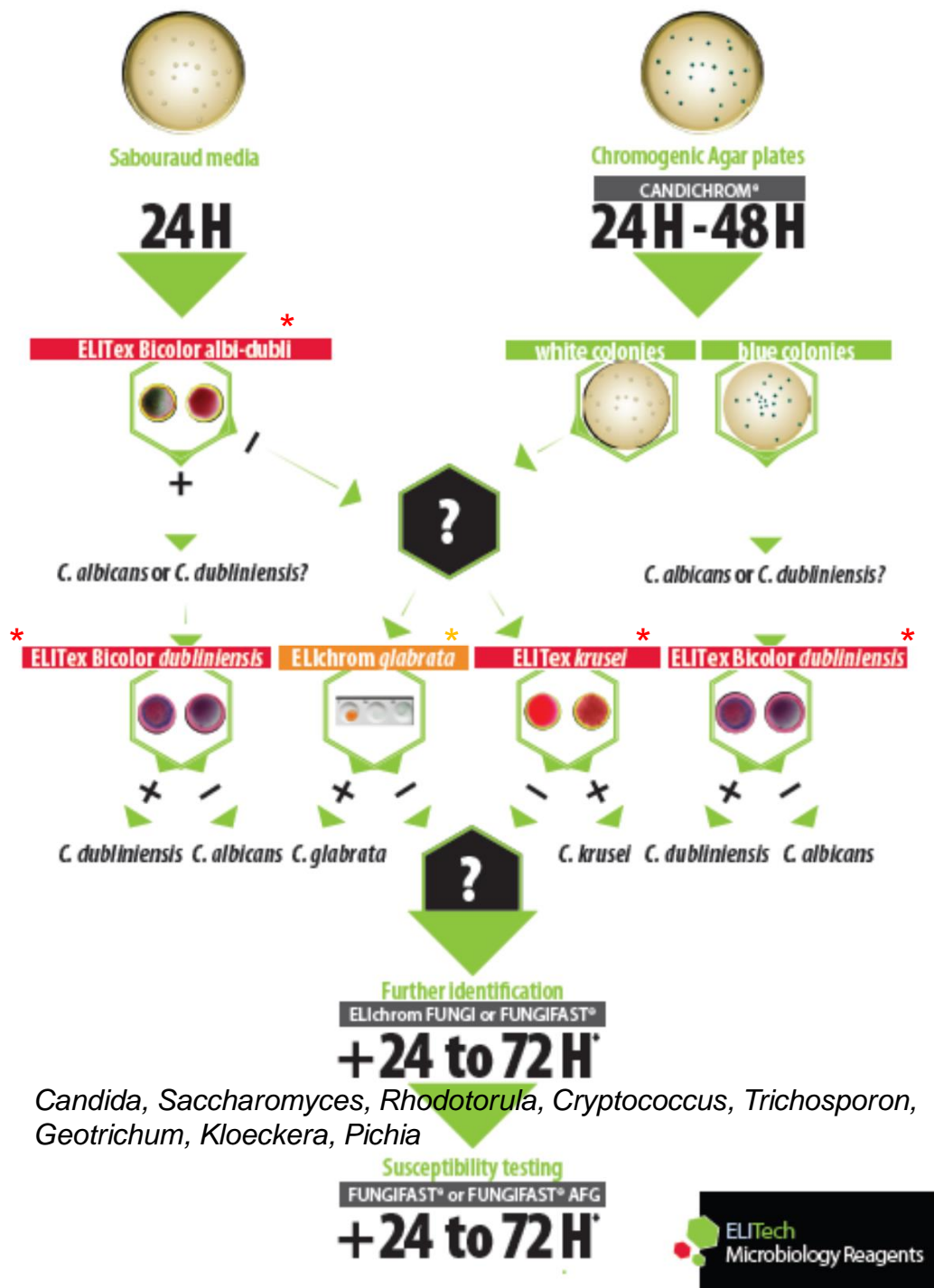
Agar	Basis of differentiation	<i>C. albicans</i>	<i>C. dubliniensis</i>
Tetrazolium salt médium	Colony color determined by the ability to reduce the tetrazolium salt	Pale pink to whitish colonies	Red to maroon colonies
Chromagar Candida (Chromagar, Paris, France; M-Tech Diagnostics Ltd, Cheshire, UK)	Colony color determined by $\beta$ - <i>N</i> -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

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
Cand>Select 4	chromogenní	Bio-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*



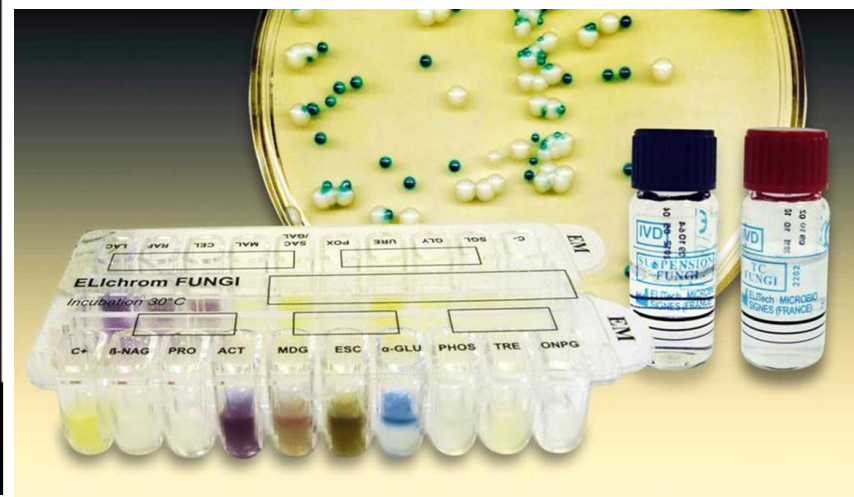
P íklad analýzy:

**CANDIchrom** . chromogenni metoda (enzymatická p em na tetrazoliové soli) 1-2 dny

\***ELITex** . latexové aglutina ní metody (protilátky) 5 minut

\***ELIchrom** . biochemický test (aktivita trehalasy) 20 minut

ELIchromFUNGI . biochemické testy 1-2 dny

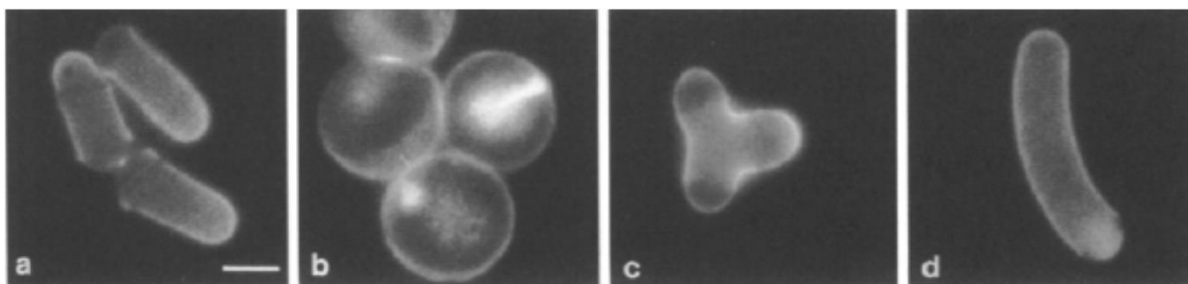




# Molekulární taxonomie

-konvenční taxonomie je problematická :

- morfologie kvasinek není stabilní (rozdíl a nárost trvá několik dní (prodlouhuje se v časné diagnóza )
- Vztahu fyziologických, enzymatických a charakteristik lze zvrátit mutací (v jediném genu)



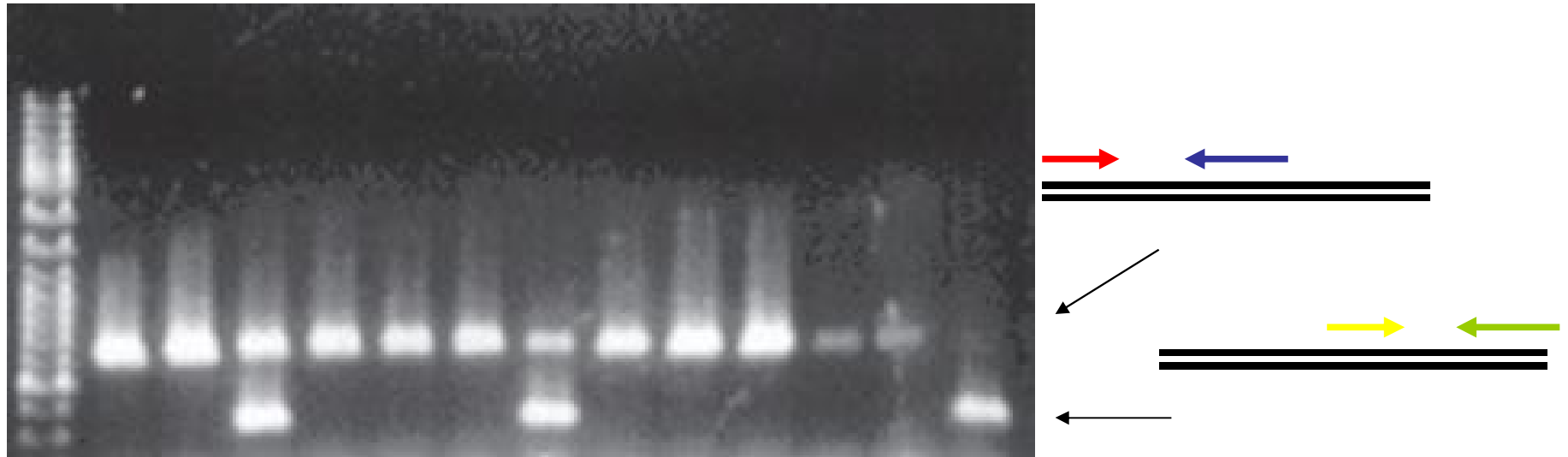
- molekulární taxonomie (komerční účely - odlizit kmeny S.c.)
- pulsní gelová elektroforéza (PFGE), FISH (karyotyp)
  - PCR, restrikční polymorfismus (odlizení druh )
  - nejnověji MALDI-TOF (taxonomie)

# Identifikace založená na odlišnosti typických sekvencí DNA

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



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



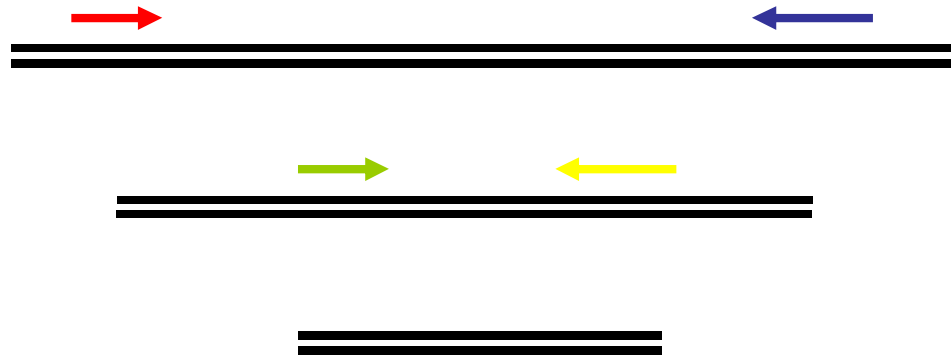
- po PCR může následovat ztření restrikční endonukleasou a odlížení druhů na základě odlišné délky ztřených produktů (tzv. **RFLP** - restriction fragment length polymorphism)





# Nested (szahnízd ná%) PCR

- “ amplifikace probíhá dvoufázov
- “ v 1. fázi je pomocí jedné sady primer namno0ena delší sekvence nukleové kyseliny
- “ takto získané amplikony jsou pak p eneseny do jiné amplifika ní zkumavky obsahujících druhou dvojici primer , specifických k vnit ní oblasti úseku amplikon
- “ konzervovaná intergenová oblast rDNA
- “ detekce gelovou elektroforézou
- “ eventuáln sekvenace



## ” 2 sady primer , intergenová oblast rDNA

Species and primers used		Sequence (5'U 3')	Annealing temperature (°C)
<u>First PCR for six <i>Malassezia</i> species<sup>†</sup></u>			
	Forward	ATCCTTTGCAGACGACTTGA	55
	Reverse	TGCTTAACTTCGCAGATCGG	
<u>First PCR for three <i>Malassezia</i> species<sup>†</sup></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	TGACTAGTGTTCGTAGGCACGGTA	
<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	TGTGCGATTGGAAGCGCACA	
<u><i>M. sympodialis</i></u>	Forward	CGCACCTTGCGCTCCATGGT	58
	Reverse	GGTACAATCCCCAGGCAGVAA	
<u><i>M. yamatoensis</i></u>	Forward	CGATCAAACCTTCTCTGTGTCCAG	59
	Reverse	TGTGTGGGAGGTAGAAGAGGCA	

<sup>†</sup>Common primers for *M. furfur*, *M. globosa*, *M. japonica*, *M. obtusa*, *M. restricta* and *M. yamatoensis*. <sup>‡</sup>Common primers for *M. dermatis*, *M. slooffiae*, *M. sympodialis*.

# Multiplex PCR

amplifikace se smíší primer (jeden univerzální, druhý specifický)



*Candida glabrata*  
397bp

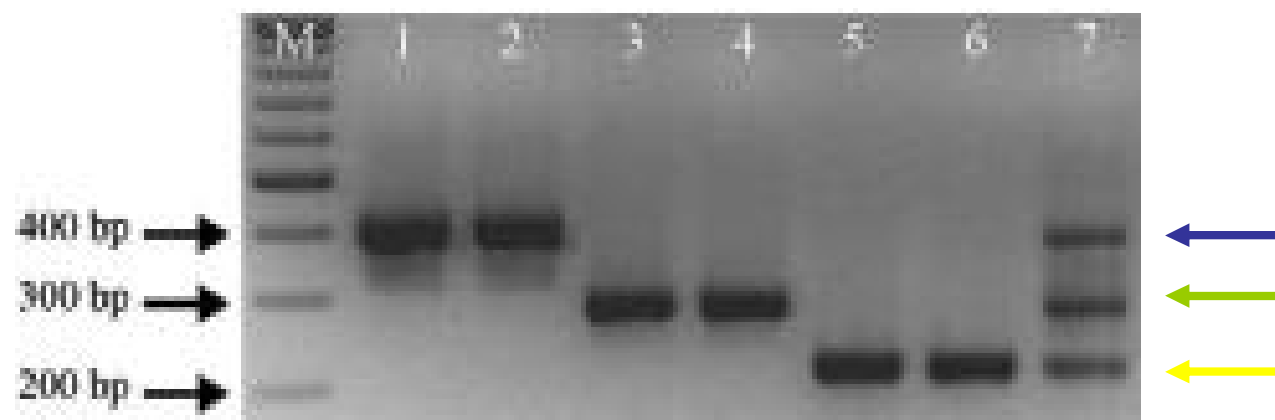


*Candida nivariensis*  
293bp



*Candida braccarensis*  
223bp

univerzální  
primer (konzervativní oblast 5.8S rDNA)



Romeo et al., J. Microbiol Met 79 (2009)

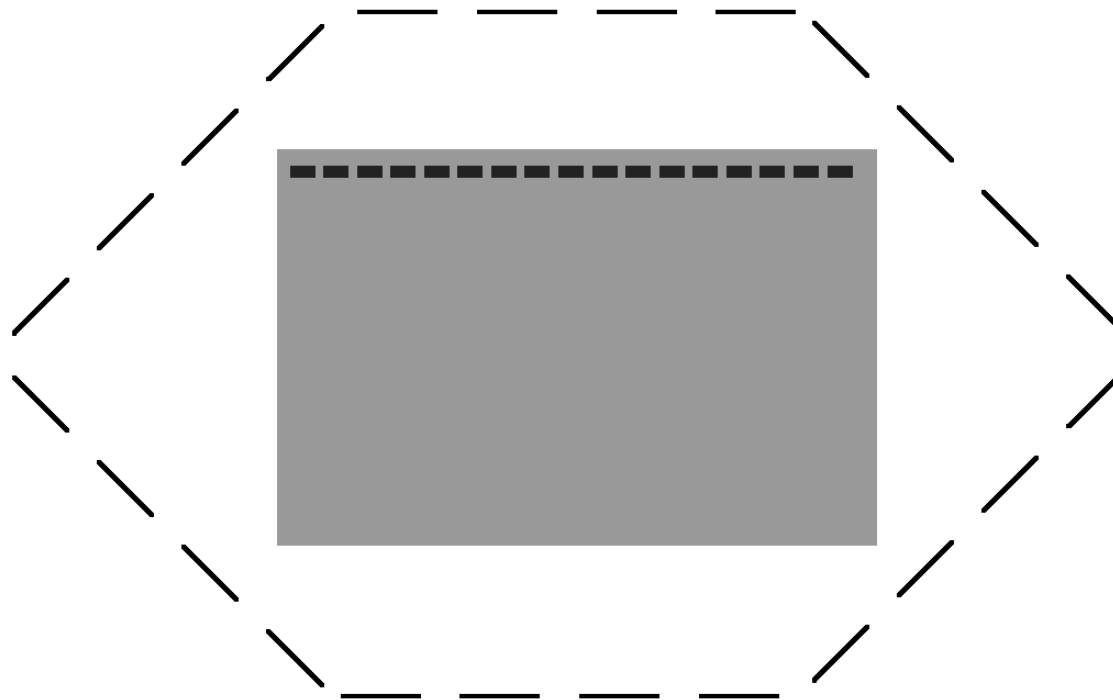
# PFGE

Klasická elektroforéza dokáže rozlízit fragmenty pouze do velikosti 40-50kb  
(v též 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 v též molekulám DNA déle, než se přeorientují - umožňuje separovat molekuly velké několik Mb)

~ contoured clamped homogeneous electric field (CHEF)

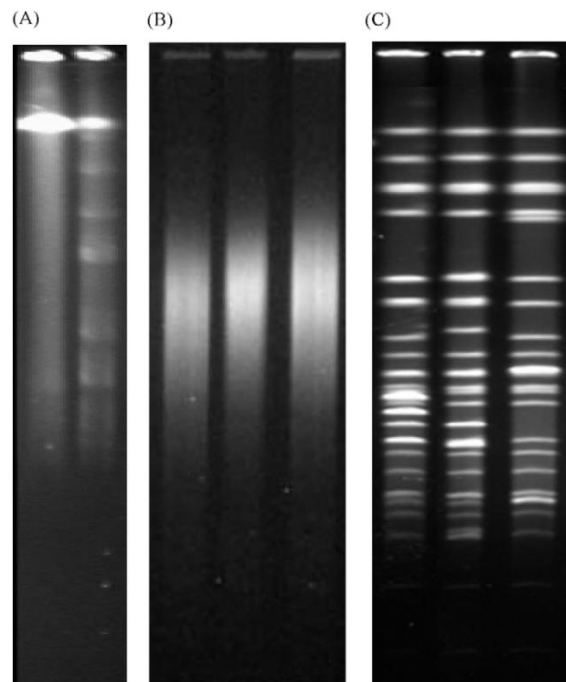
~ gel obsahuje vzorky DNA uvnitř agarózových bloků (minimalizace náhodných zlomů velkých molekul DNA)





# Karyotypizace

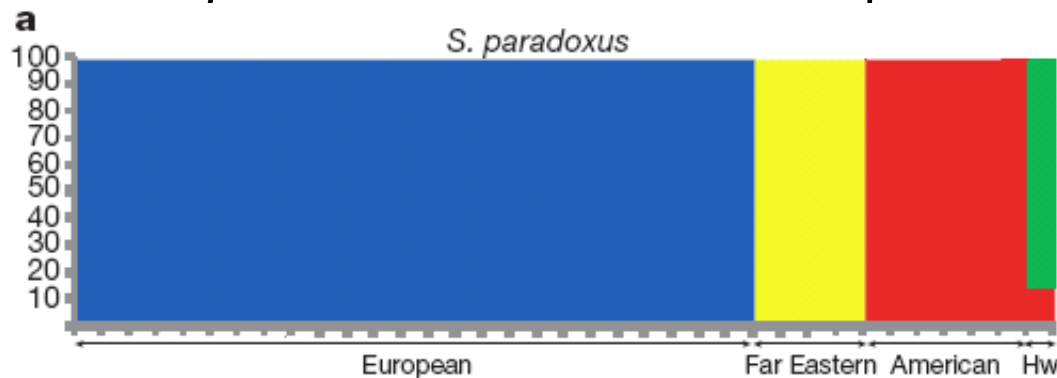
- “ S.c. kmeny mají podobný karyotyp . v tzinou se liší délkou chromosomu XII (podle po tu rDNA gen )
- “ Pr myslové kvasinky jsou v tzinou polyploidní . homologní chromosomy mají odlišné velikosti
- “ Srovnání kmen pro fylogenetické účely (intaktní nebo RE nazt pené chromosomy)
- “ Ur ení p íbuznosti izolát jednoho druhu pro epidemiologické účely nap . kmeny z r zných míst od jednoho pacienta, kmeny od 2 r zných pacient , kmeny od zdravotního personálu a pacient



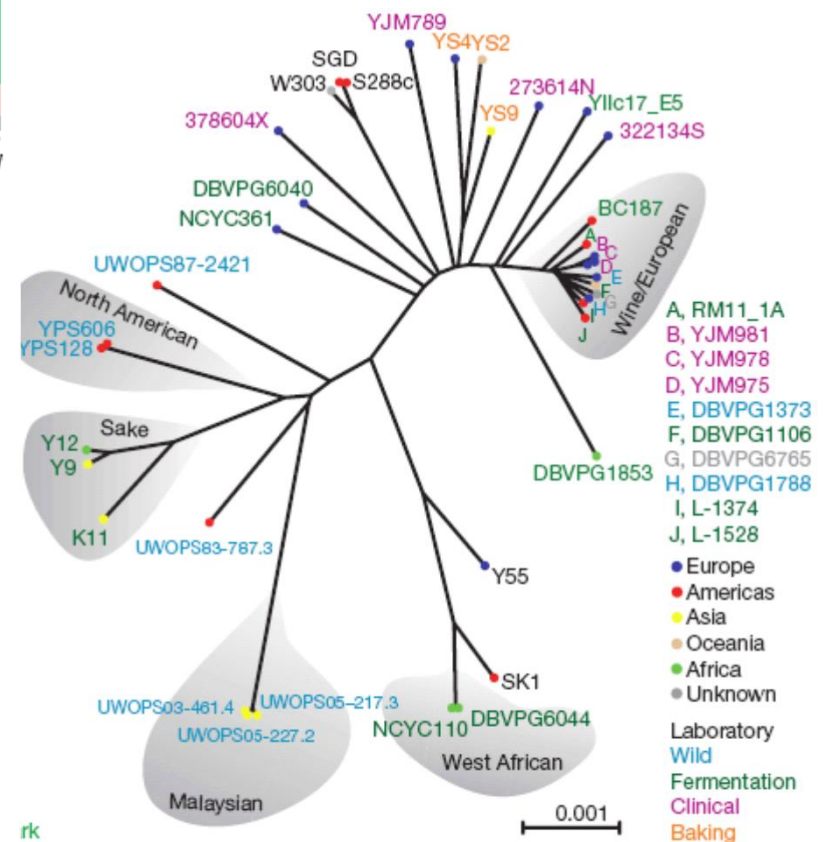
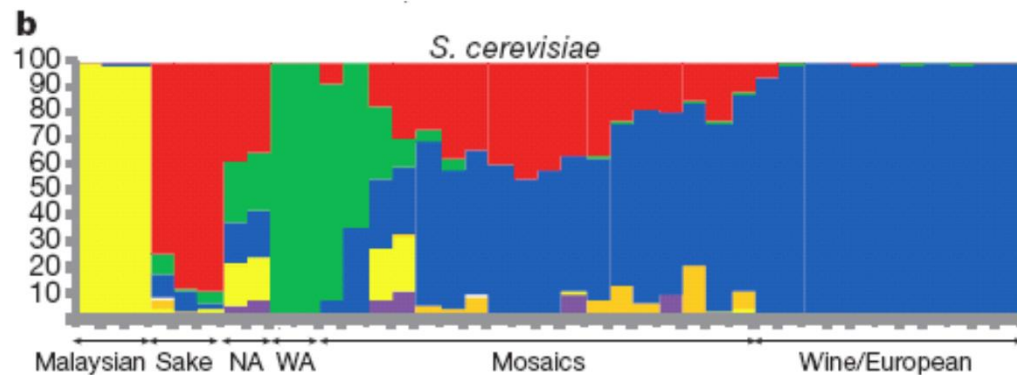
- (A) Nekompletní nazt pení RE
- (B) Degradace nukleázy
- (C) Oprava p ídáním 75 mM thiourey do pufru

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

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

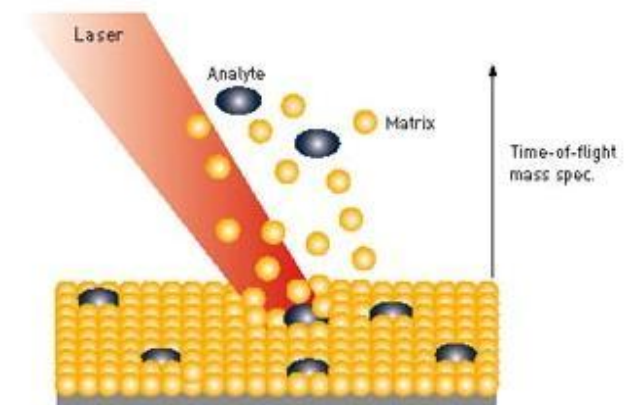
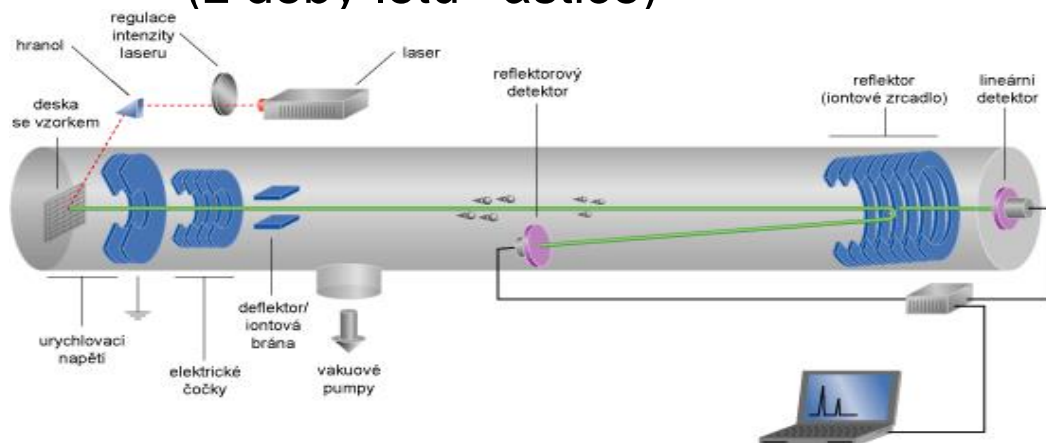


- “ *S. cerevisiae* - 3-4 p vodní linie, které se díky lovů ku k í0ily ÷

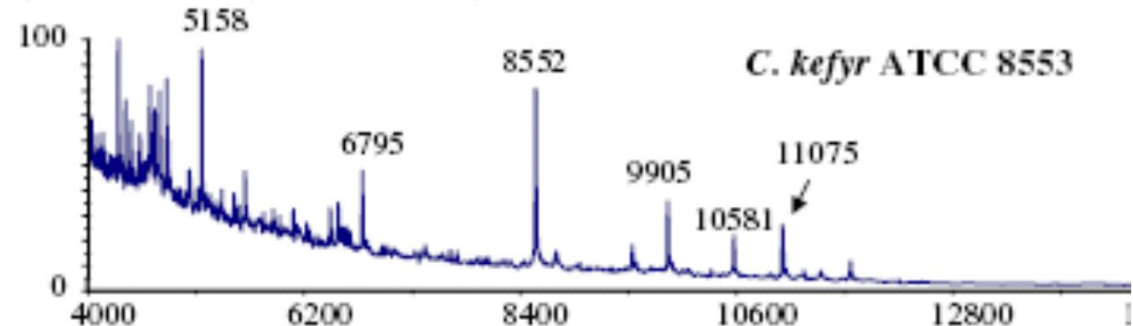
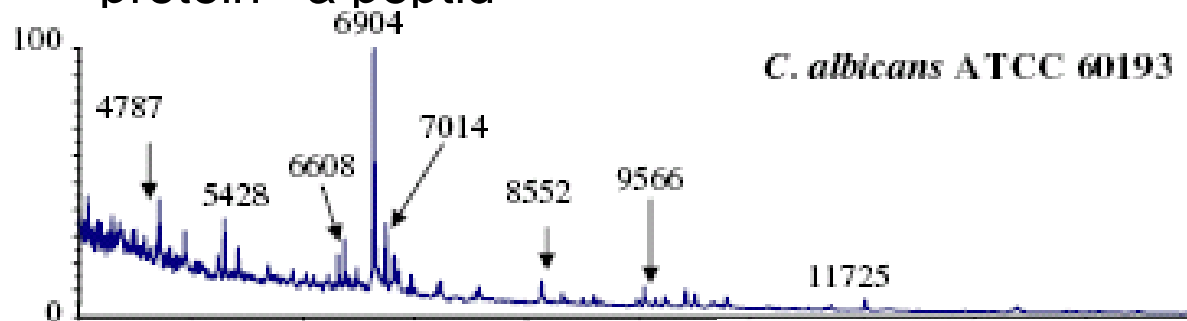


# MALDI-TOF

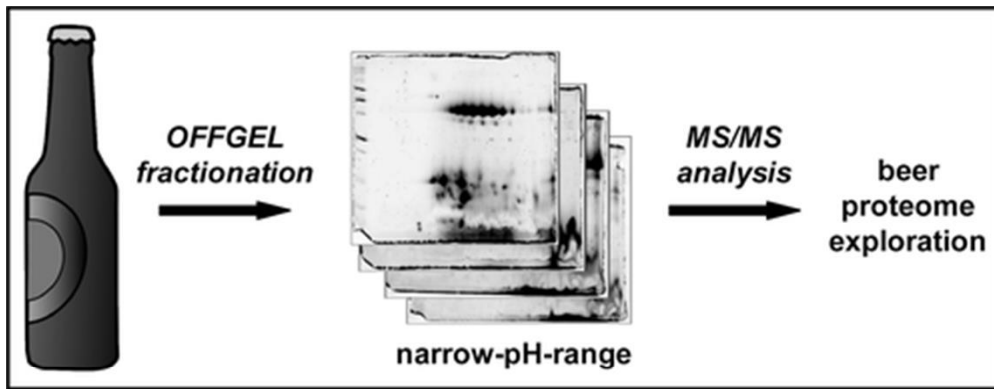
- “ hmotnostní spektrometrie s laserovou desorpcí a ionizací za účasti matrice s priletovým analyzátozem (matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. MALDI-TOF)
- “ Umožňuje odpaření a ionizaci netěkavých biologických vzorků z pevné fáze přímo do plynné
- “ Vzorek je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



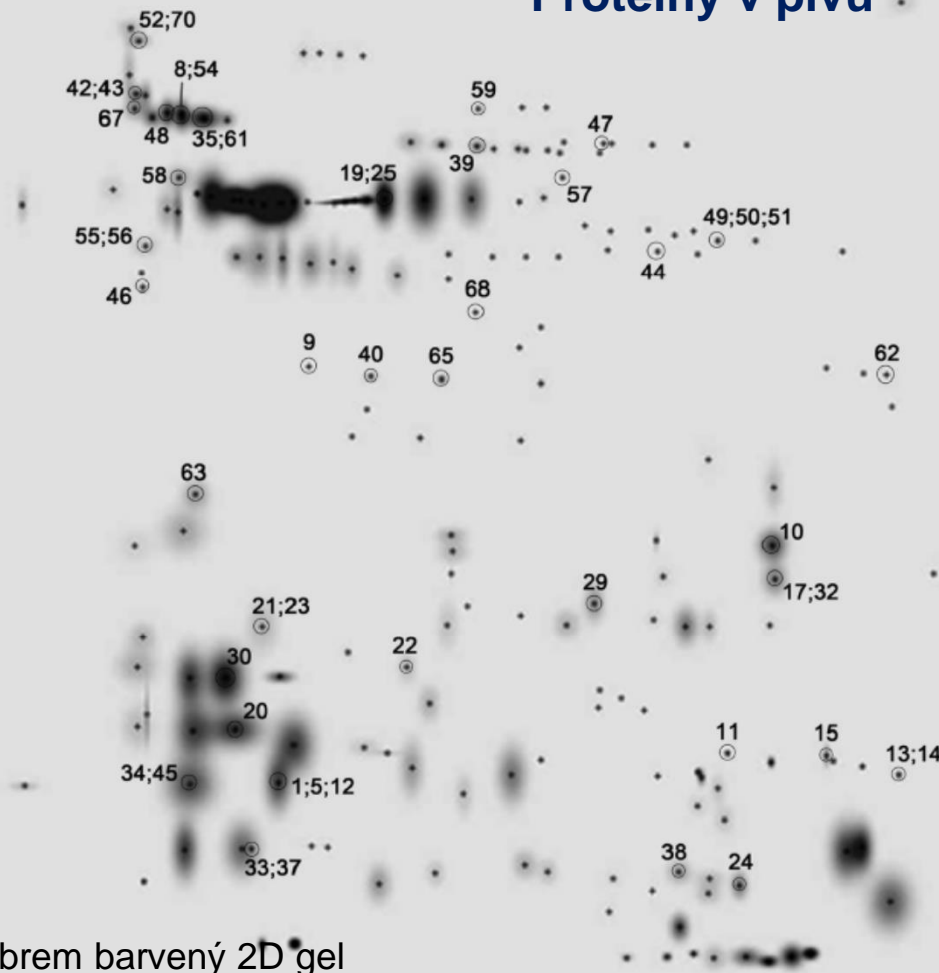
- “ MALDI-TOF hmotnostní spektrum je zobrazením etnosti ionizovatelných částic buněného proteomu
- “ Charakter spektra závisí na krystalizaci a ionizačních vlastnostech vzorku → výška píku je rovna relativní koncentraci proteinu v místě ionizace
- “ Při srovnávání spekter druhů uvnitř rodu se hledají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







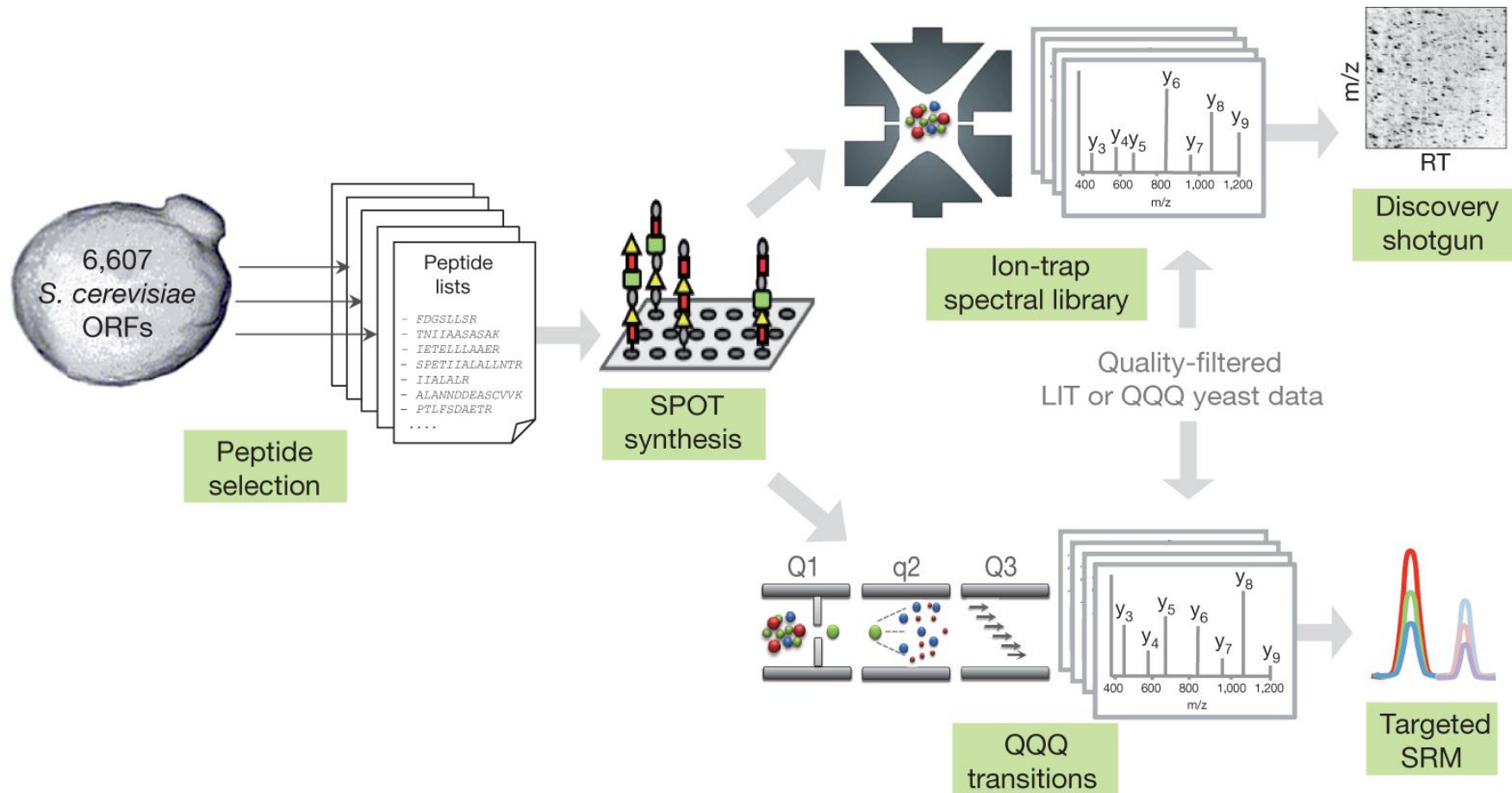
## Proteiny v pivu



St íbrem 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- $\beta$ -1,3-glucanase	797	7
47	gil171455	enolase	1542	15
48 <sup>b</sup>	gil46395590	glucan 1,3- $\beta$ -glucosidase	90	1
49 <sup>b</sup>	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- $\beta$ -glucanase	491	9
55	gil6322303	mannose-containing glycoprotein	75	4
56	gil968906	NCA3	299	5
57 <sup>b</sup>	gil6321973	Oye2p	82	1
58	gil6325103	Pep4p	80	4
59	gil6319673	Pgilp	446	4
60 <sup>b</sup>	gil6324696	profilin	86	4
61 <sup>b</sup>	gil6322382	Pry1p	70	1
62	gil6322697	tetrameric phosphoglycerate mutase	519	9
63	gil6323138	thioredoxin peroxidase	757	4
64 <sup>b</sup>	gil6319638	Tos1p	132	1

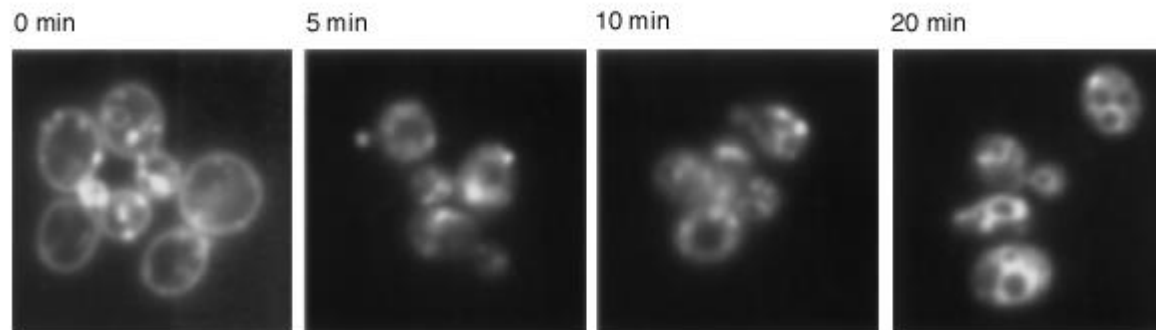
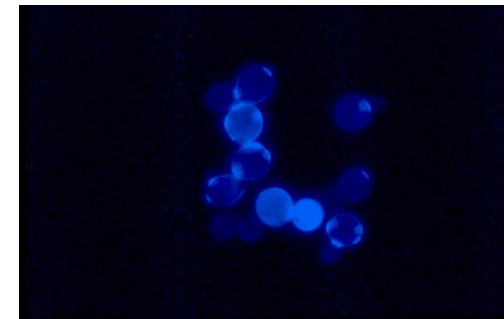
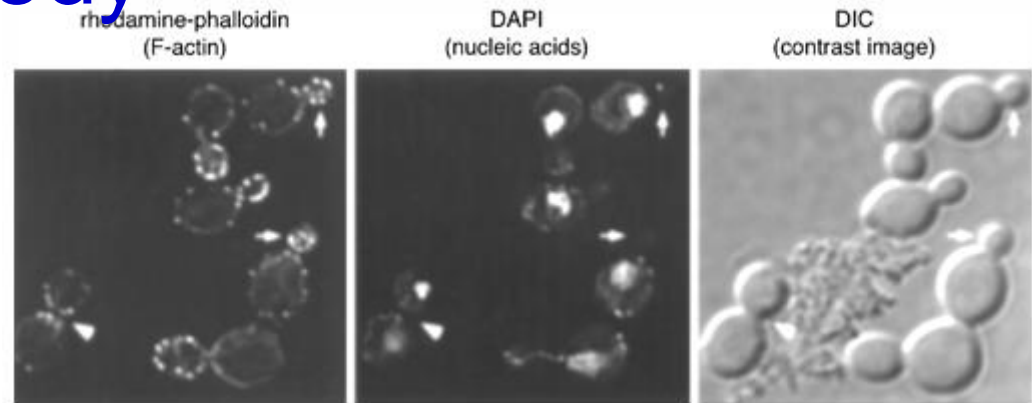
Vygenerování referenční mass-spectrometric mapy pro kvasinkový proteom  
 Tak jako se sekvenoval kvasinkový genom (první eukar.), tak se sekvenuje proteom. slouží ke sledování exprese/přítomnosti proteinů v kvasinkové buňce za různých podmínek/situací (např. změny proteomu v průběhu buněčného cyklu,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



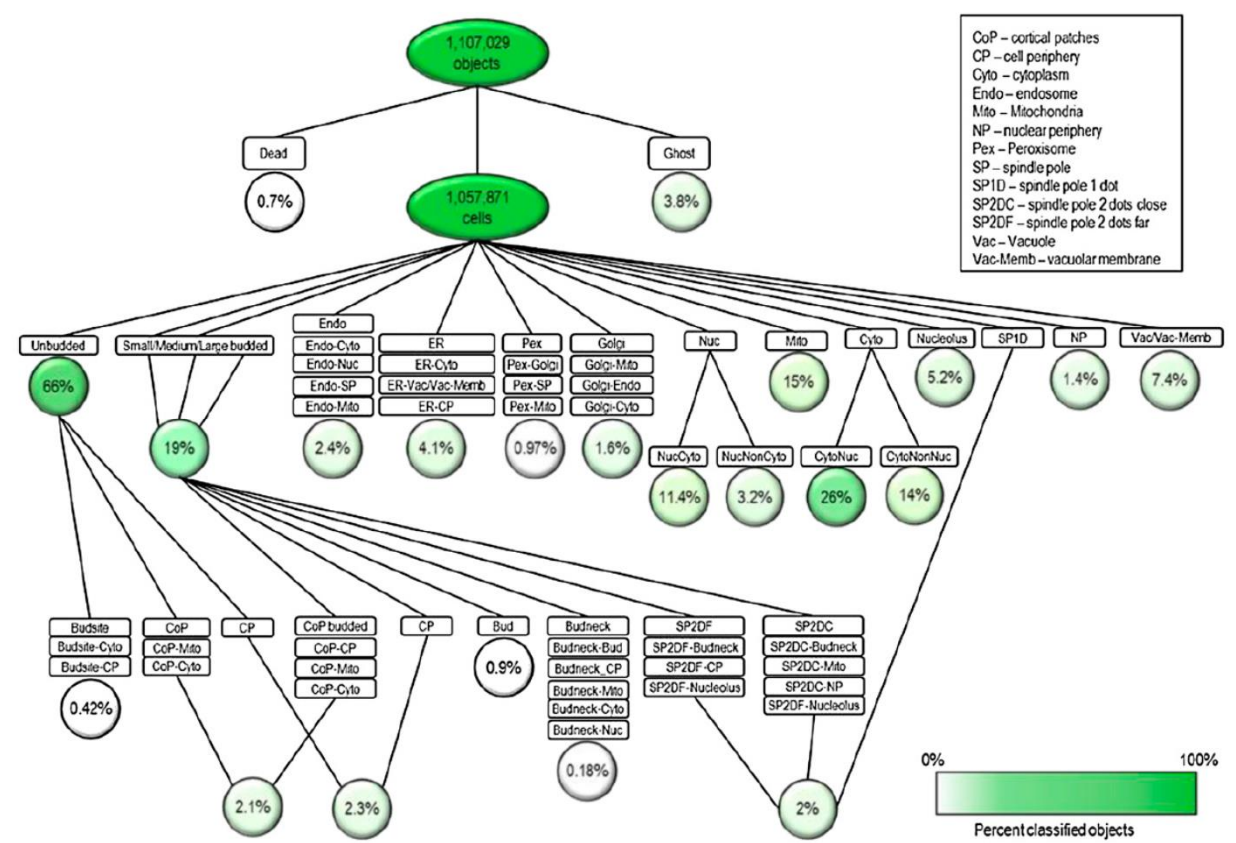
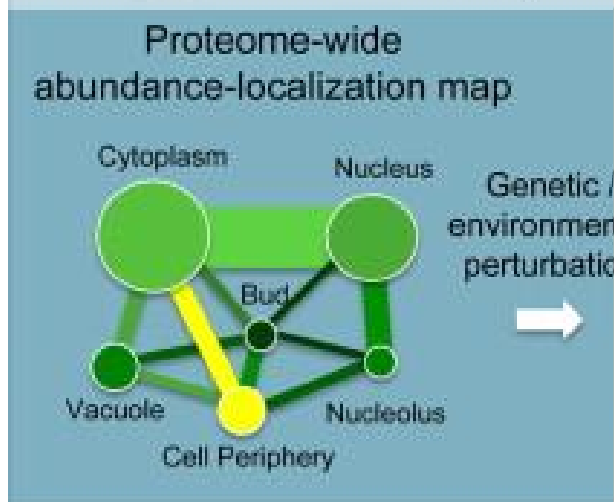
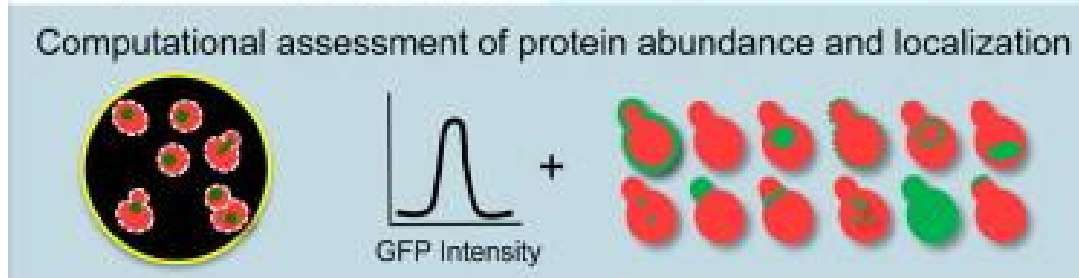
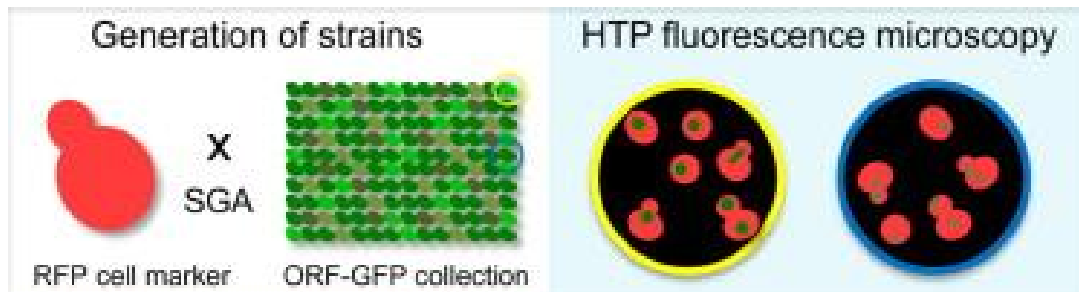
# Fluorescen ní metody

## Techniky barvení

- . FISH . lokalizace spec. sondy
- . DNA/jádro . **DAPI**
- . aktinový . **phalloidin**
- . bun ěná st ěna . **calcofluor**
- . Endocytóza ->vakuoly ě **FM4-64**
- . Mitochondrie, ER - **DiOC<sub>6</sub>**  
(3,3 -dihexyloxacarbocyanine iodide)



- . proteiny tagované GFP (*in vivo*)



Chong et al., Cell, 2015

Koh et al., G3, 2015

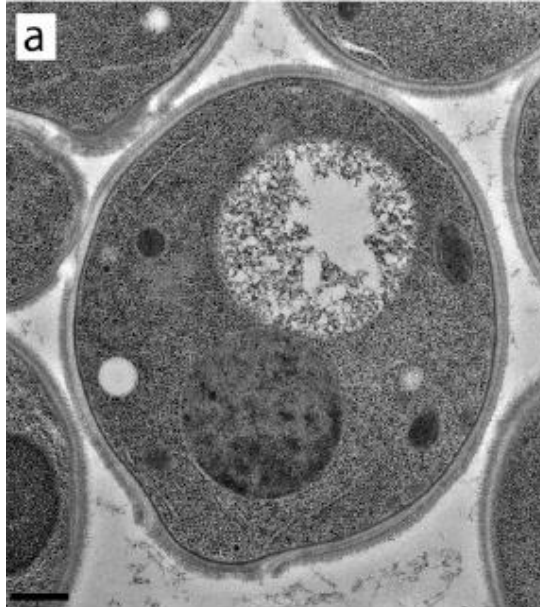
<http://cyclops.ccb.utoronto.ca/>



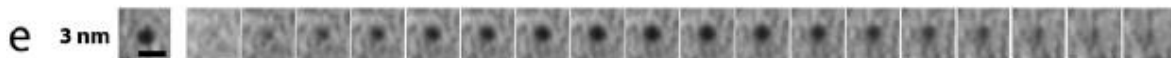
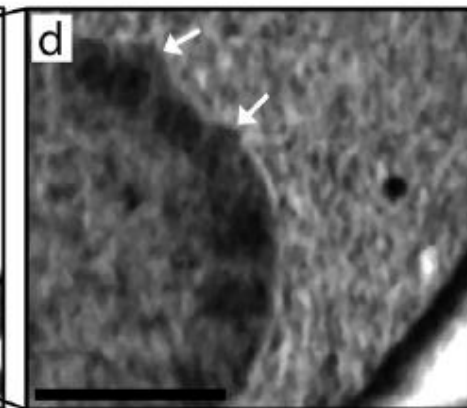
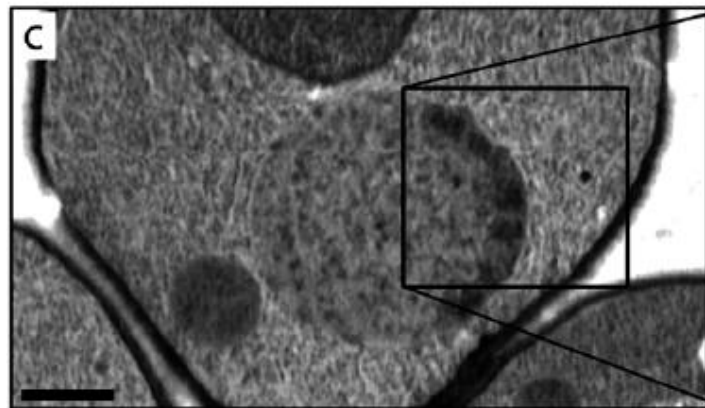
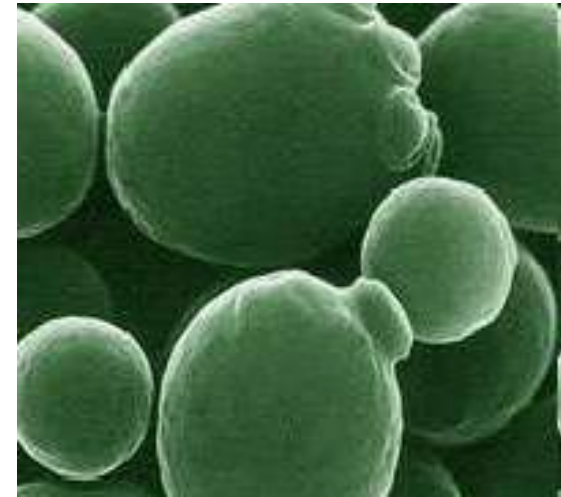
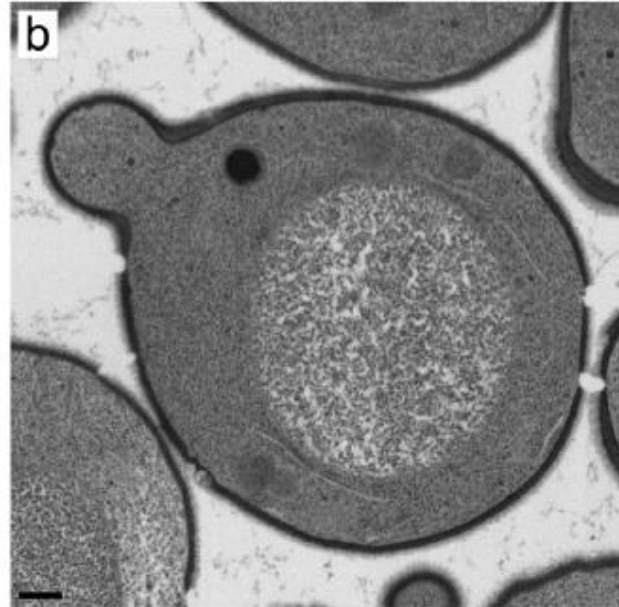
# Elektronová mikroskopie

Wei, et al., BioTechniques, 2012

TEM



FIB - SEM



- studium bun ěné st ny  
õ organel (sekrece õ )  
více prof. Kopecká a prof.  
Svoboda

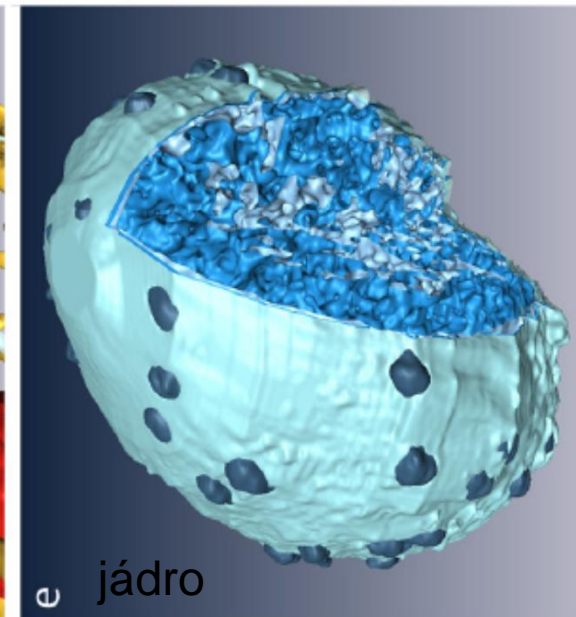
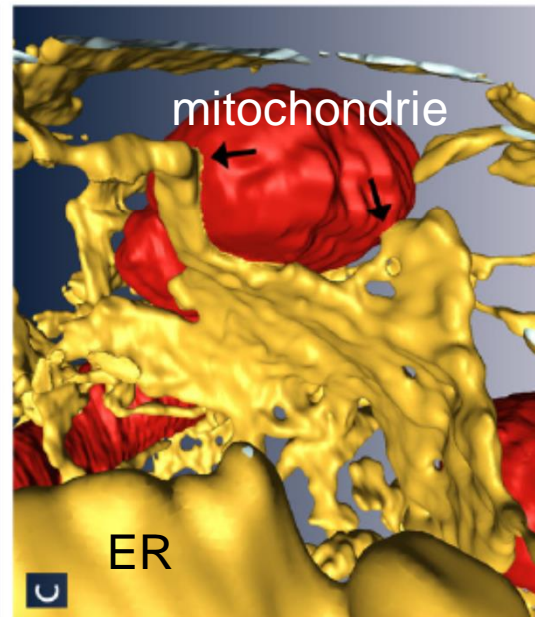
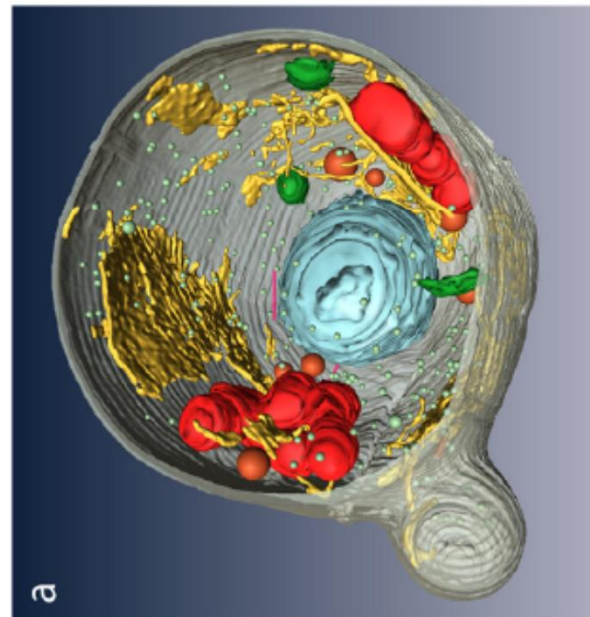
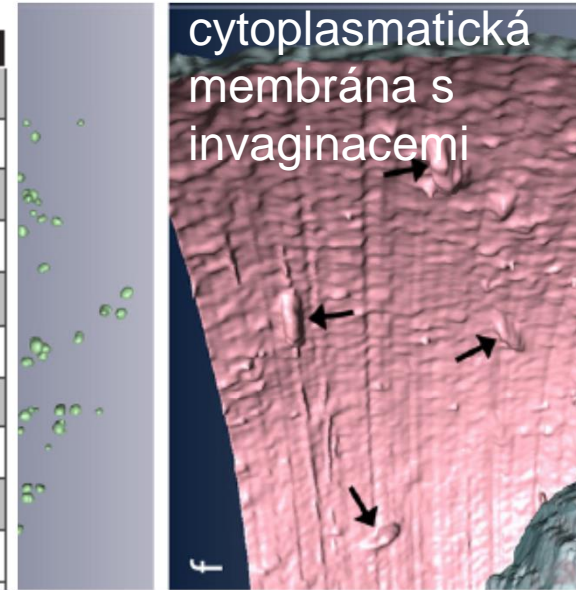
- zipky ukazují na jaderné  
põry

- vzorek sprosáknut%  
epoxyprysky ící a osmiem

- sfocused-ion beam  
scanning%po 3nm

**Table 1. Quantitative Analysis of Cellular Components.**

Cellular component	Volume ( $\mu\text{m}^3$ )	Volume Percentage	Surface Area ( $\mu\text{m}^2$ )
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

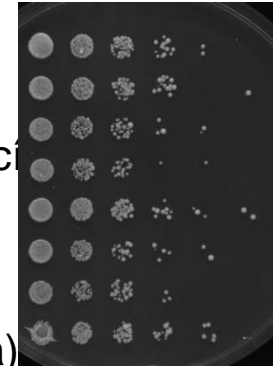


Wei, et al., BioTechniques, 2012

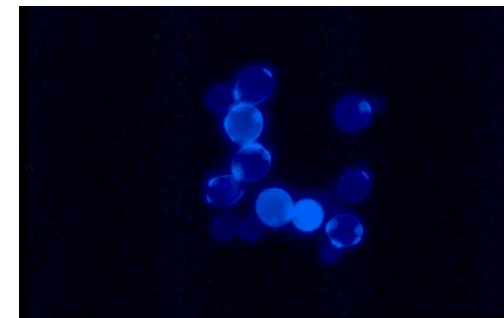
[http://www.biotechniques.com/multimedia/archive/00182/Cyzmmek\\_Supplementa\\_182027a.mpg](http://www.biotechniques.com/multimedia/archive/00182/Cyzmmek_Supplementa_182027a.mpg)



# 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 atd.)
- “ 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 upravovat deleční a mutantní kmeny
- “ Vydrží v >15% glycerolu na -70°C indefinitně



- “ 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 sekvencovaný genom (genomové aplikace)
- “ EuroFan projekt . delece všech *S.c.* genů (+GFP, +2-hybrid)
- “ Mikroipy - expresní profily za různých podmínek
- “ 6. FP . 3D Repertoire konsorcium (<http://www.3drepertoire.org>) -strukturu všech 800 komplexů *S. cerevisiae*
- “ Údava životních dějů má analogii v procesech v savčích buňkách (lidské geny testovány v kvasinkách - nemoci, metabolismus, regulační mechanismy)

