

Biologia molekularna z genetyką

P. Golik i M. Koper

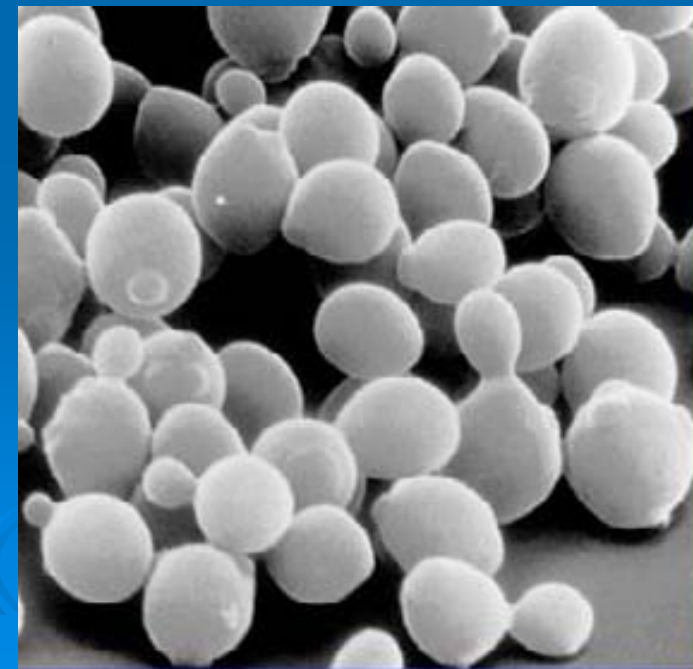
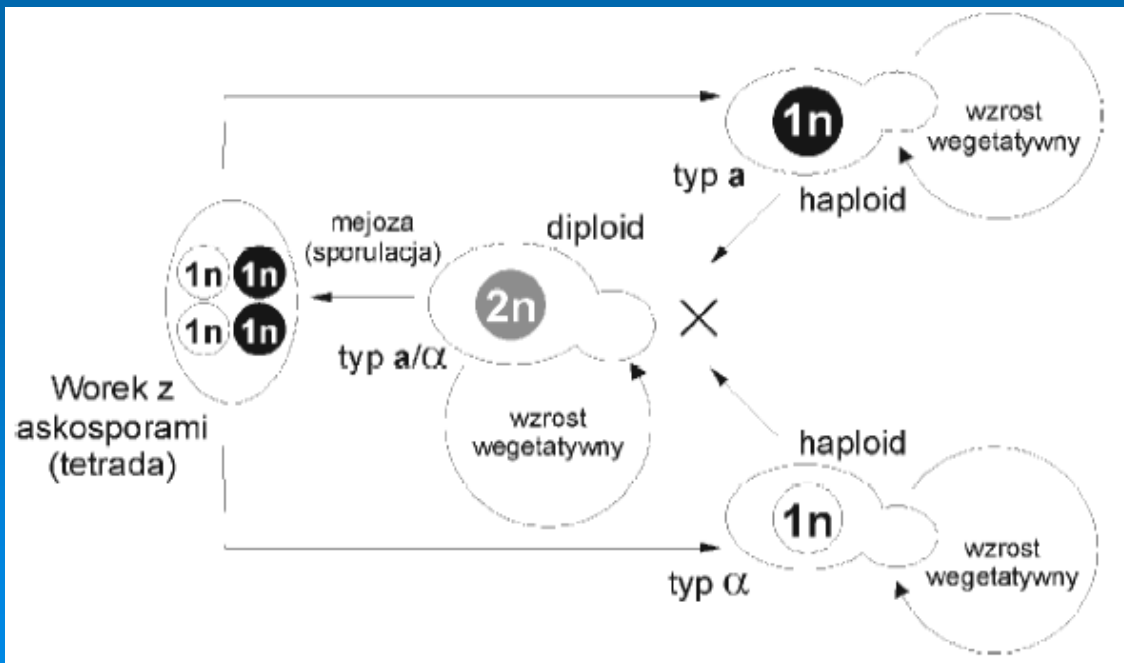
Konwersatorium 3: Analiza genetyczna eukariontów – *Saccharomyces cerevisiae*

Makrokierunek: Bioinformatyka i Biologia Systemów; 2016

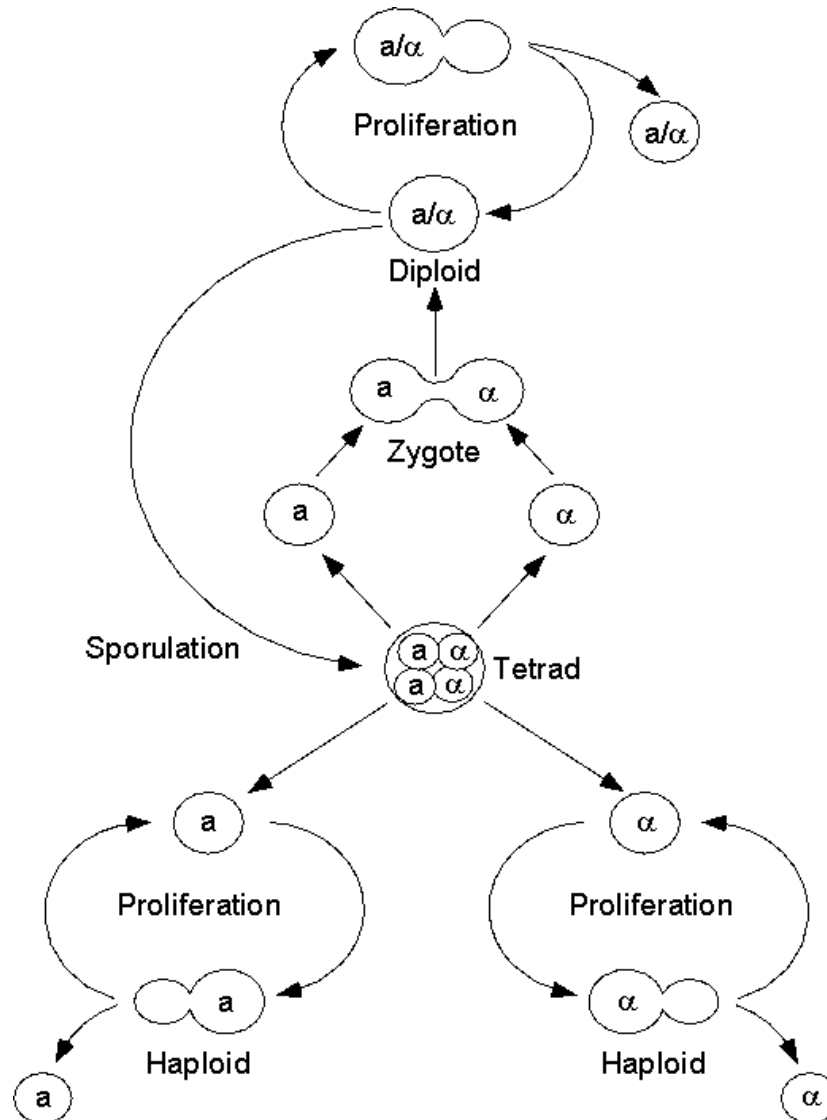
**Opracowano na podstawie materiałów
dydaktycznych Instytutu Genetyki i Biotechnologii
UW dla kursu Genetyki D na Wydz. Biologii.**

Drożdże *Saccharomyces cerevisiae*

- Łączą cechy *Procaryota* i *Eucaryota* („Yeast as the *E. coli* of *Eucaryotic Cells*”).
- Są łatwe w hodowli (czas generacji 1,5-2h w 30°C) i manipulacji.
- Nie są patogenami.
- Stosunkowo niewielki genom, ok. 12 Mb („tylko” 3,5 raza większy niż *E. coli*).
- Wiele białek jest konserwowane pomiędzy drożdżami a ludźmi. Kilkadziesiąt genów ludzkich komplementuje mutacje drożdżowe, ponadto ok. 140 ludzkich genów związanych z chorobami ma homologi w drożdżach.



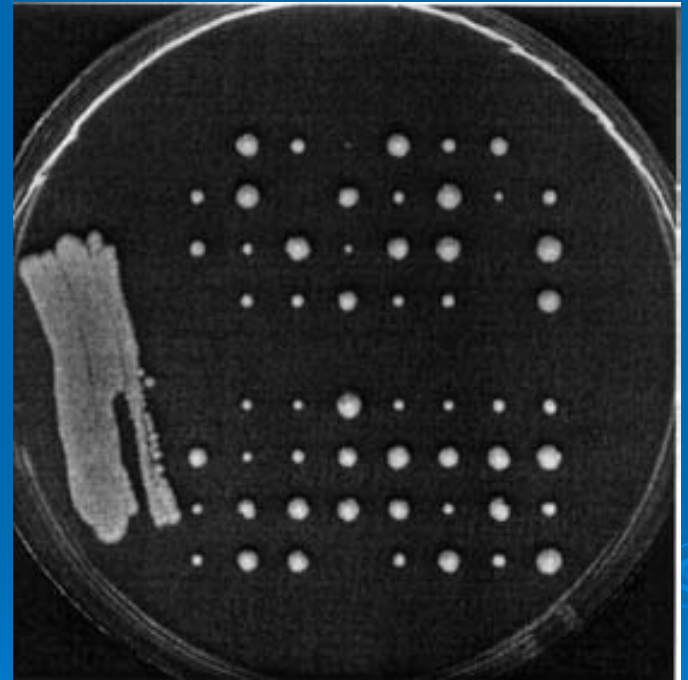
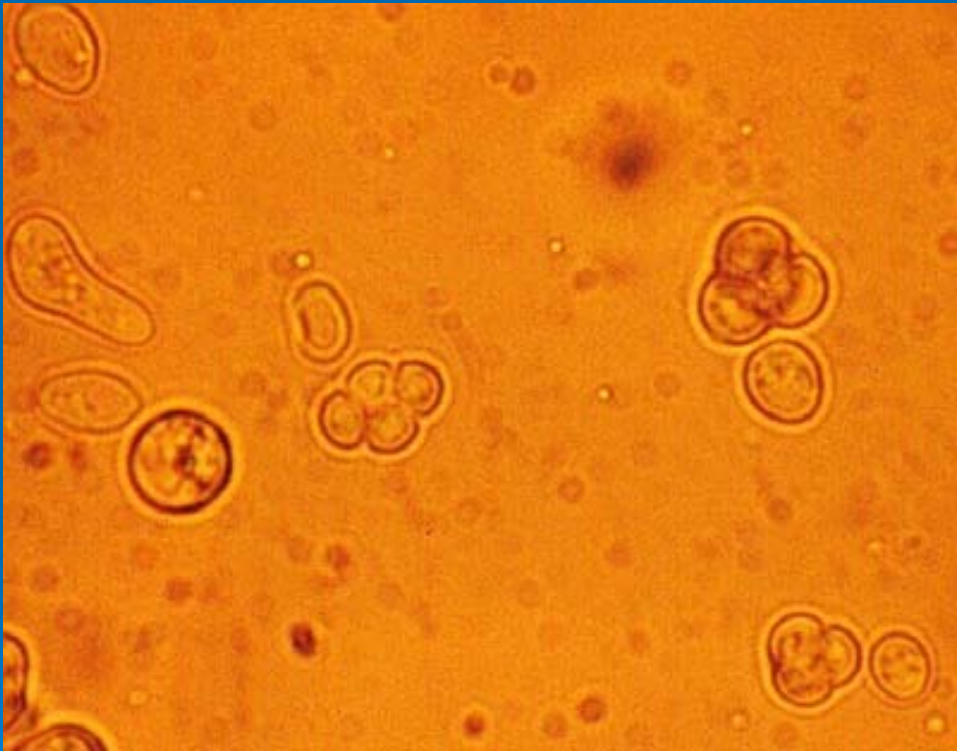
Cykl życiowy drożdży *Saccharomyces cerevisiae*



Pączkujące komórki drożdży



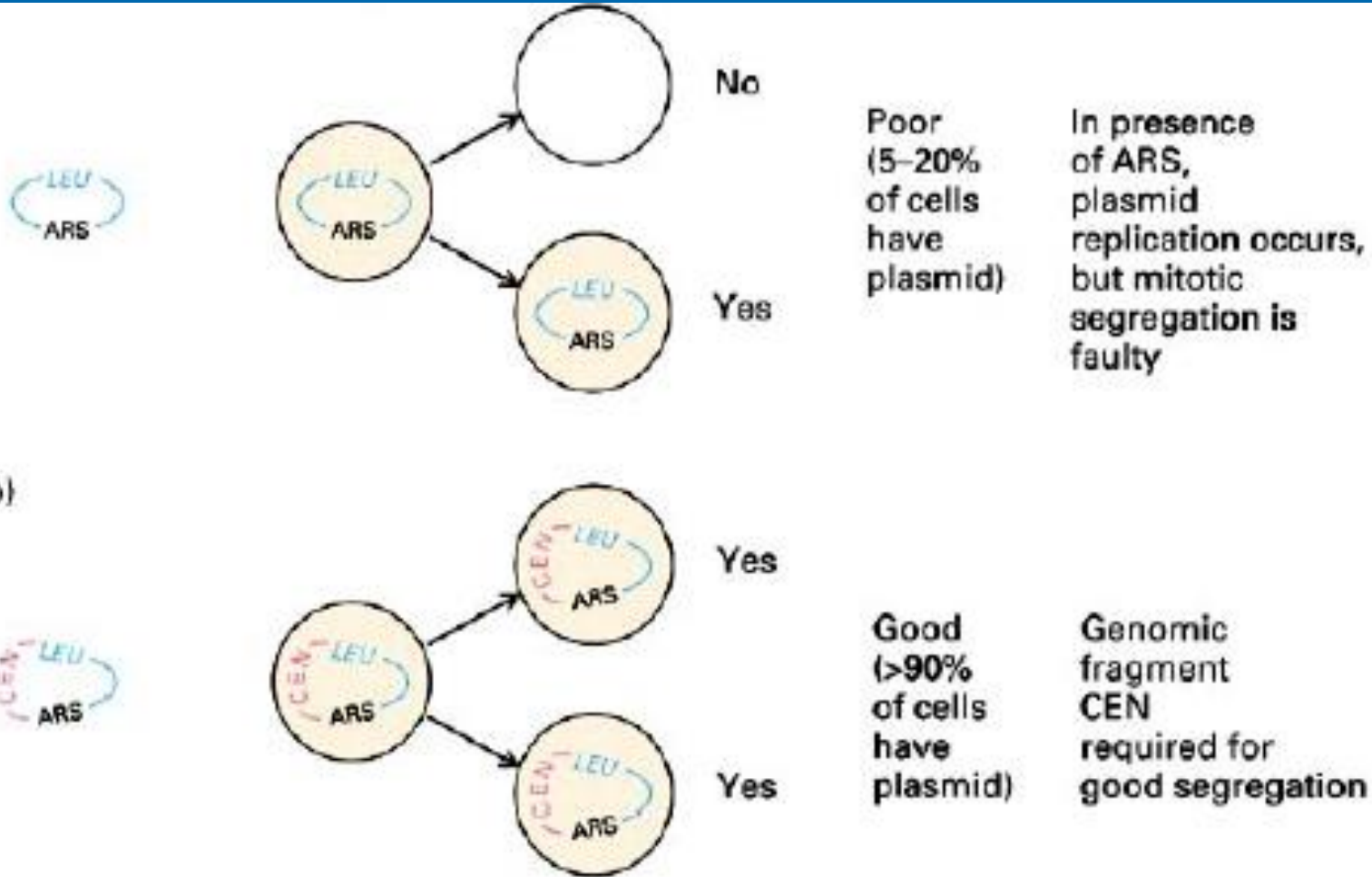
Tetrady



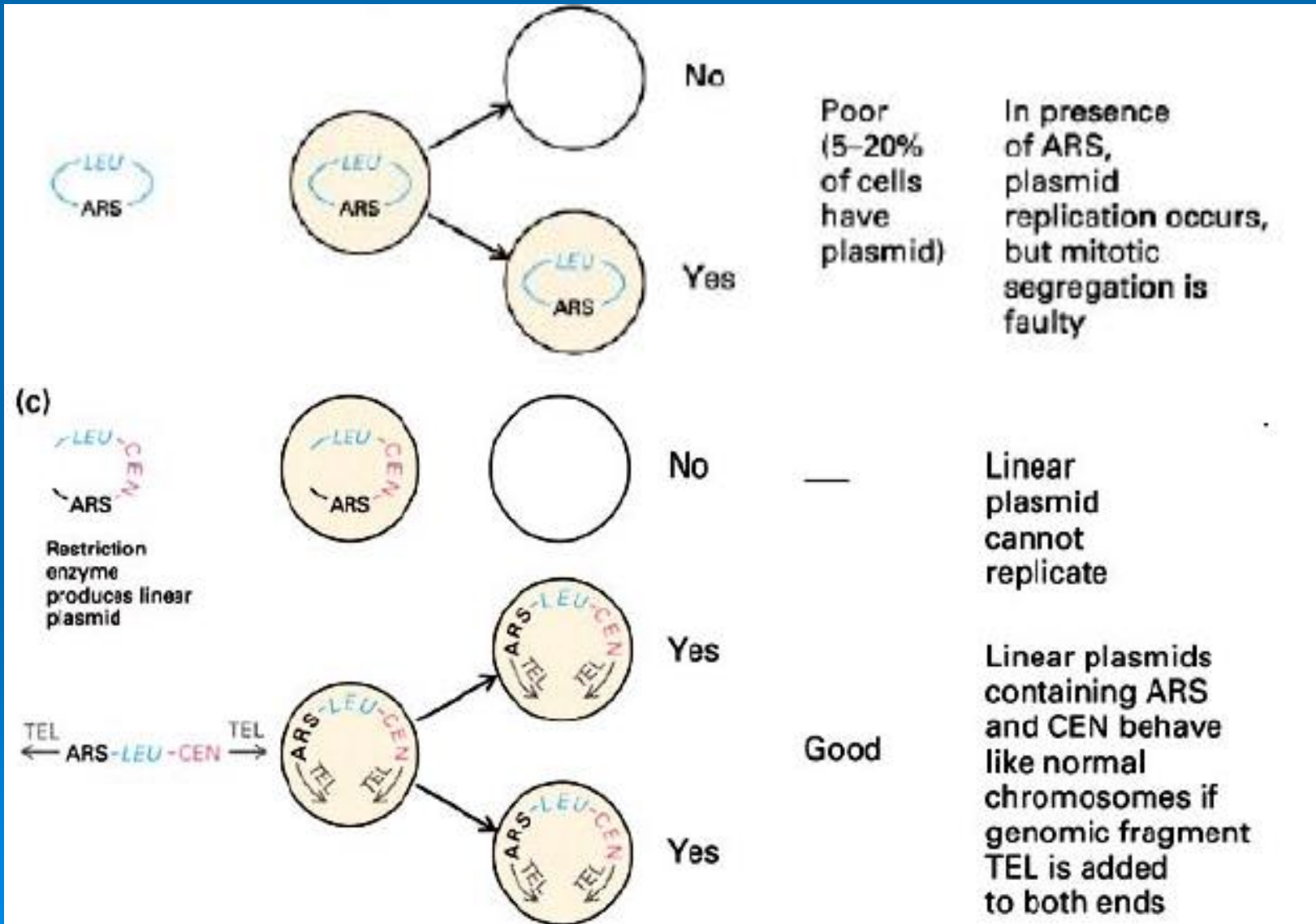
Przyjemności pracy z drożdżami

- W cyklu życiowym drożdży istnieją etapy haploidalny i diploidalny, co pozwala łatwo badać mutacje w genach metabolizmu podstawowego.
- Mogą rosnąć zarówno w warunkach tlenowych (pożywka z gliceryną), jak i beztlenowych (pożywka z glukozą).
- Drożdże można łatwo transformować, zarówno plazmidami, jak i liniowym DNA; wydajność transformacji do 10^4 transformantów na 1 μg DNA.
- Od 1996 roku znana jest sekwencja genomu *Saccharomyces cerevisiae*. Informacje o nim zintegrowane są w bazie danych SGD, na stronie www.yeastgenome.org
- Drożdże są wygodnym narzędziem badania interakcji genetycznych – SLS (ang. *synthetic lethal screen*) oraz fizycznych: białko-białko (system dwuhybrydowy), białko-DNA (s. jednohybrydowy) i białko-RNA (s. trójhybrydowy).

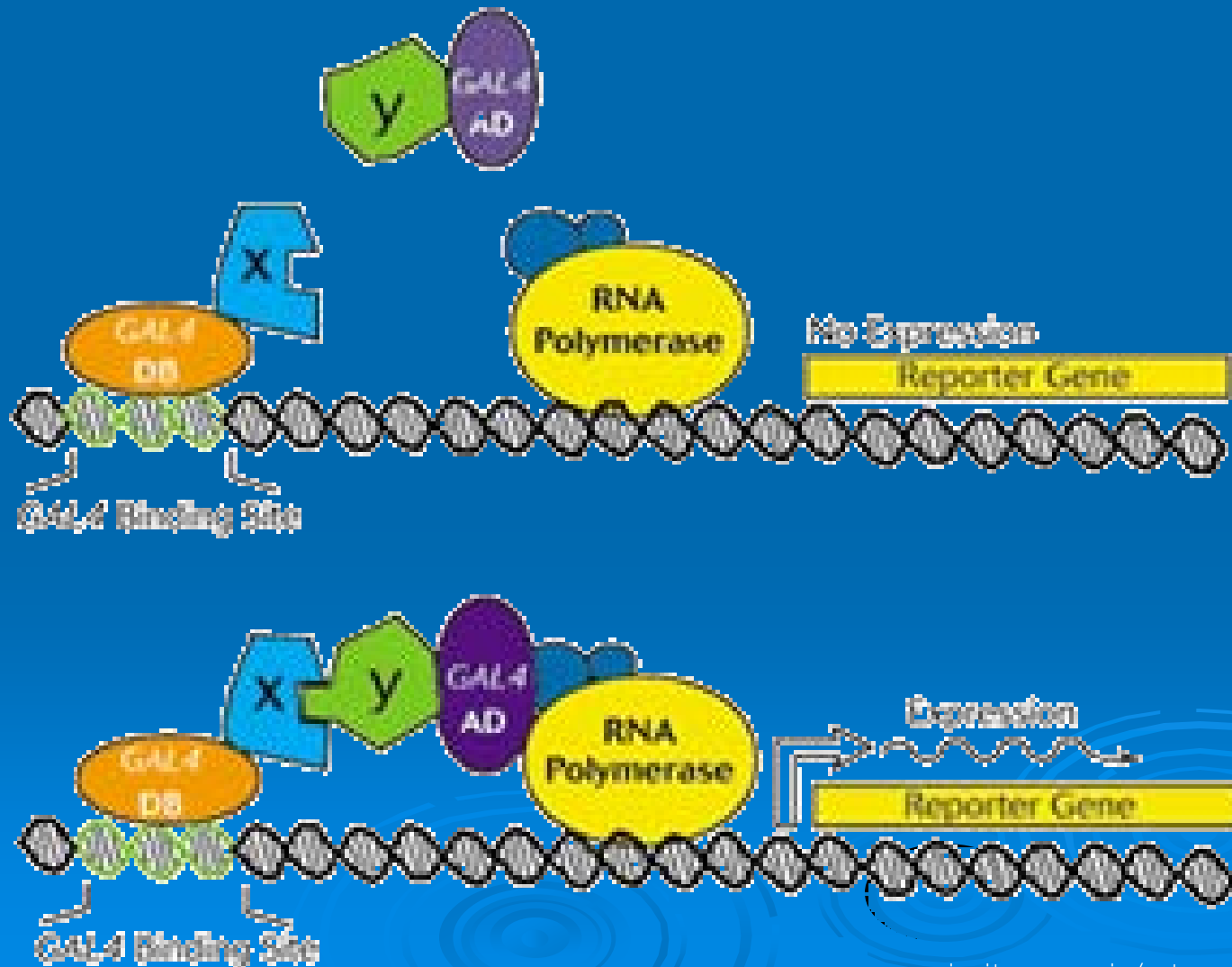
Elementy wektorów drożdżowych



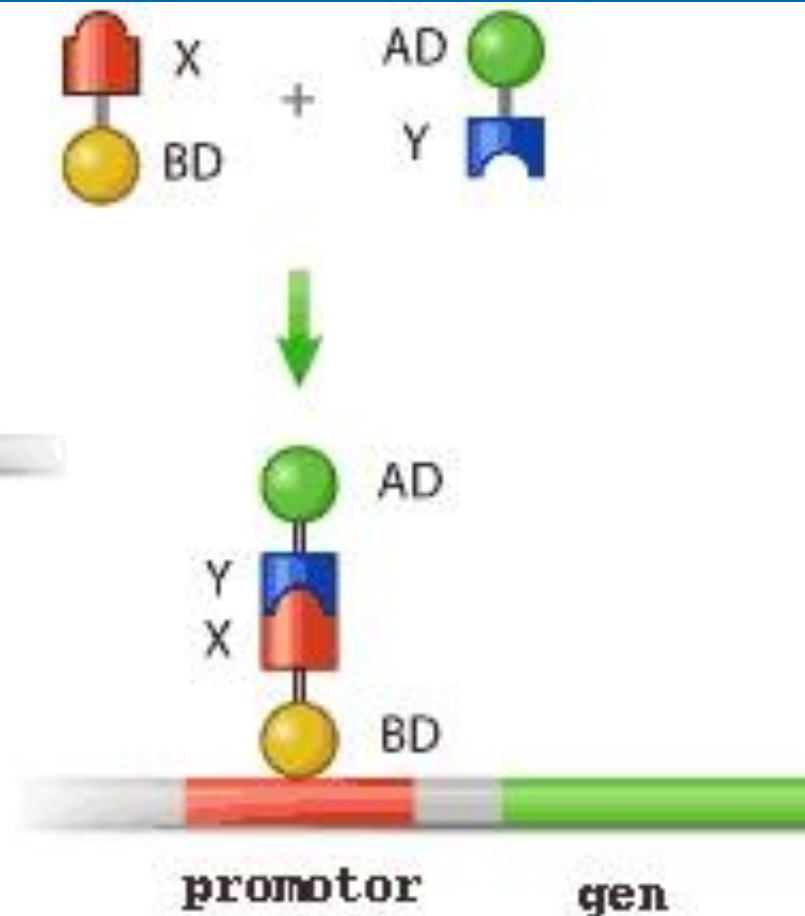
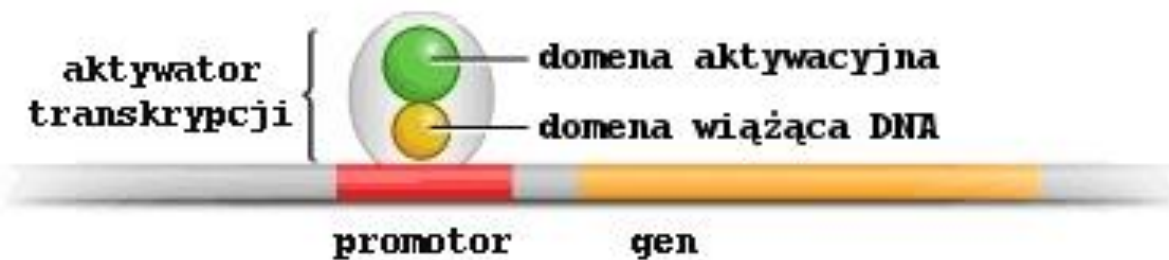
Elementy wektorów drożdżowych



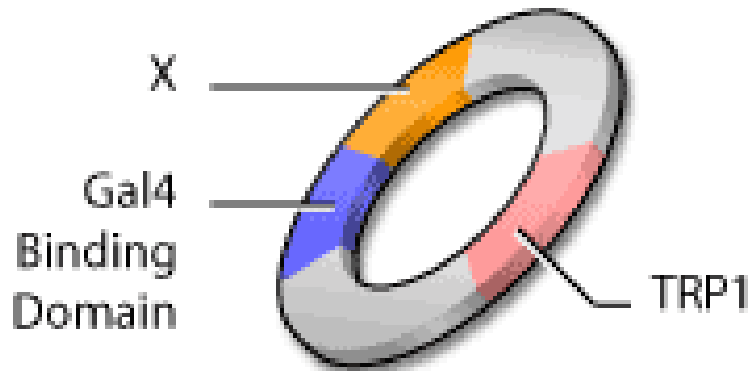
Drożdżowy system dwuhybrydowy: badanie interakcji pomiędzy białkami *in vivo*



System dwuhybrydowy: domenowa budowa czynników transkrypcyjnych

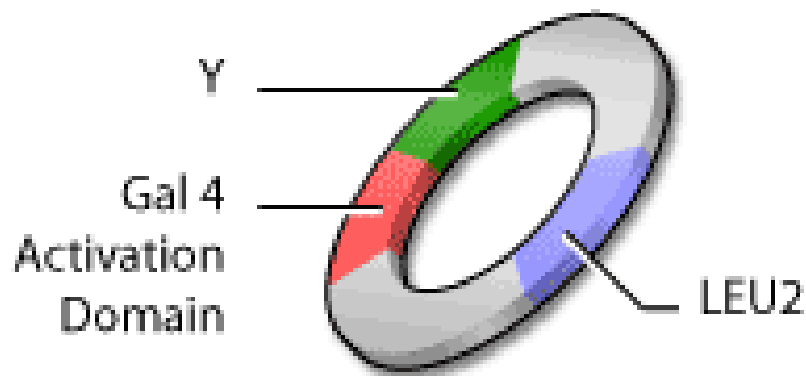


System dwuhybrydowy: konstrukcja białek fuzyjnych



DNA-BD Plasmid

encodes

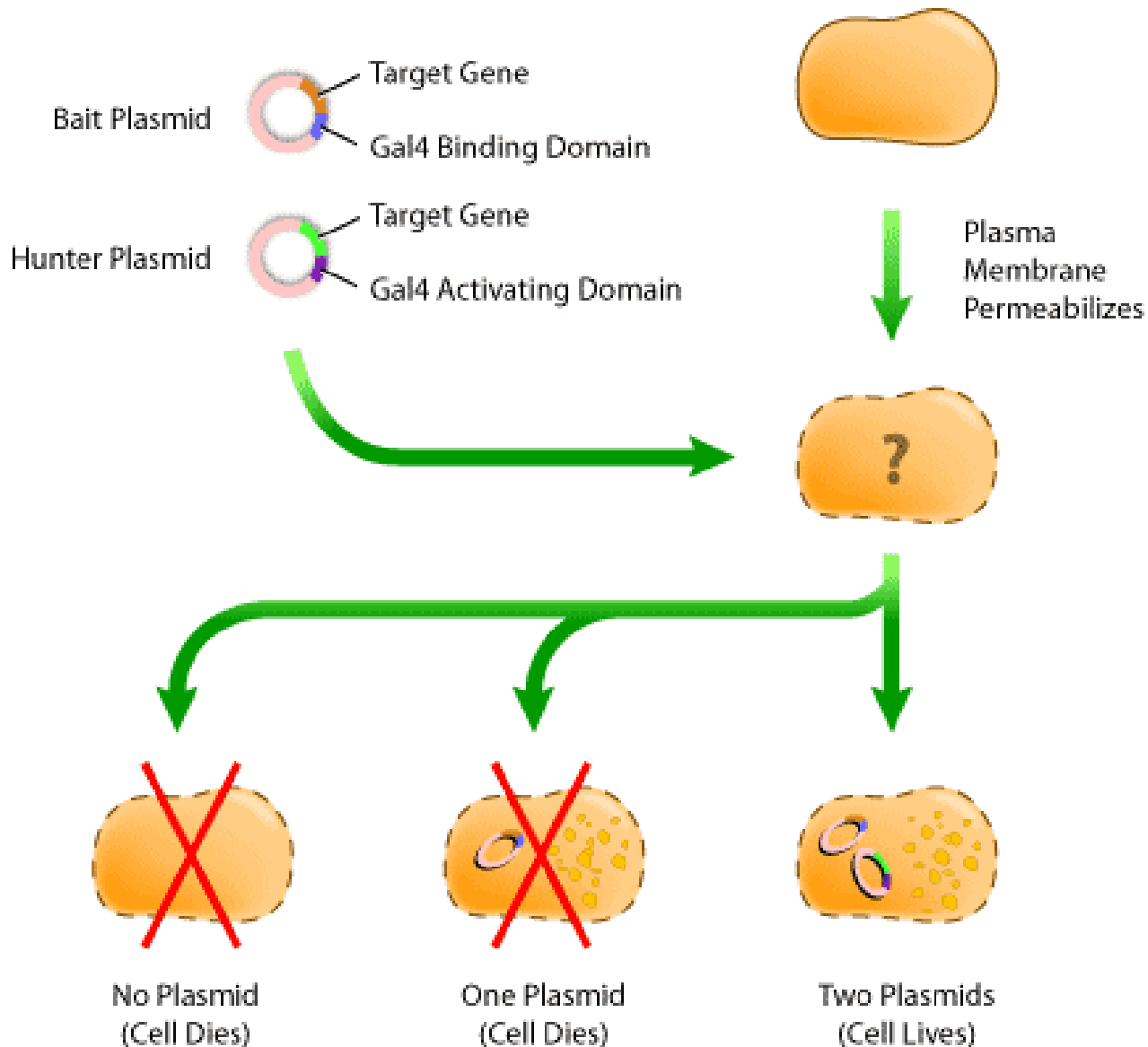


AD Plasmid

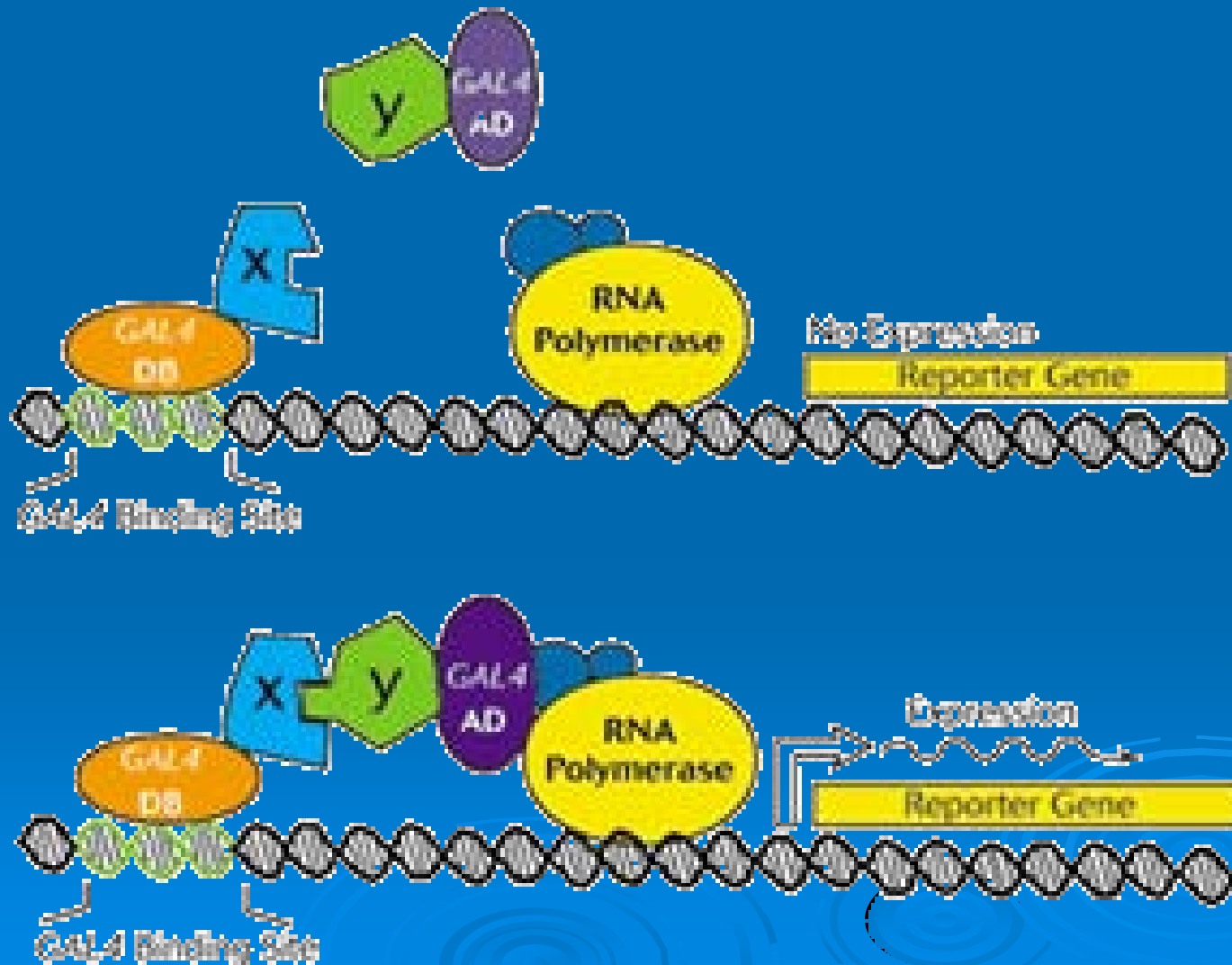
encodes




System dwuhybrydowy: transformacja drożdży



System dwuhybrydowy: ekspresja genu reporterowego



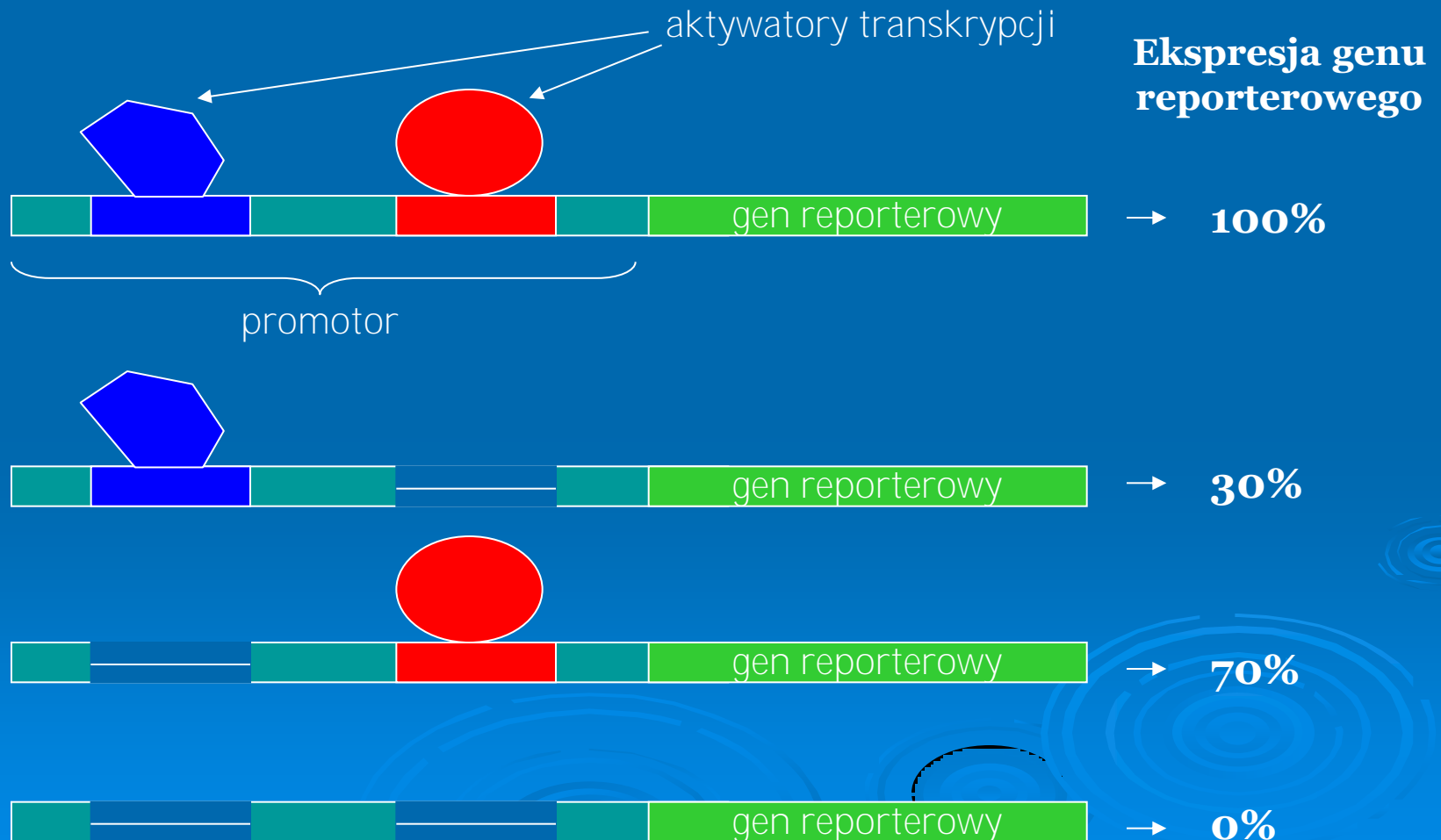
Geny reporterowe

- Badanie regionów promotora odpowiedzialnych za regulację ekspresji genu
 - Badanie zmian ekspresji w wyniku działania czynników zewnętrznych
 - Identyfikacja oddziaływań pomiędzy białkami
 - Określenie lokalizacji badanego białka
- 

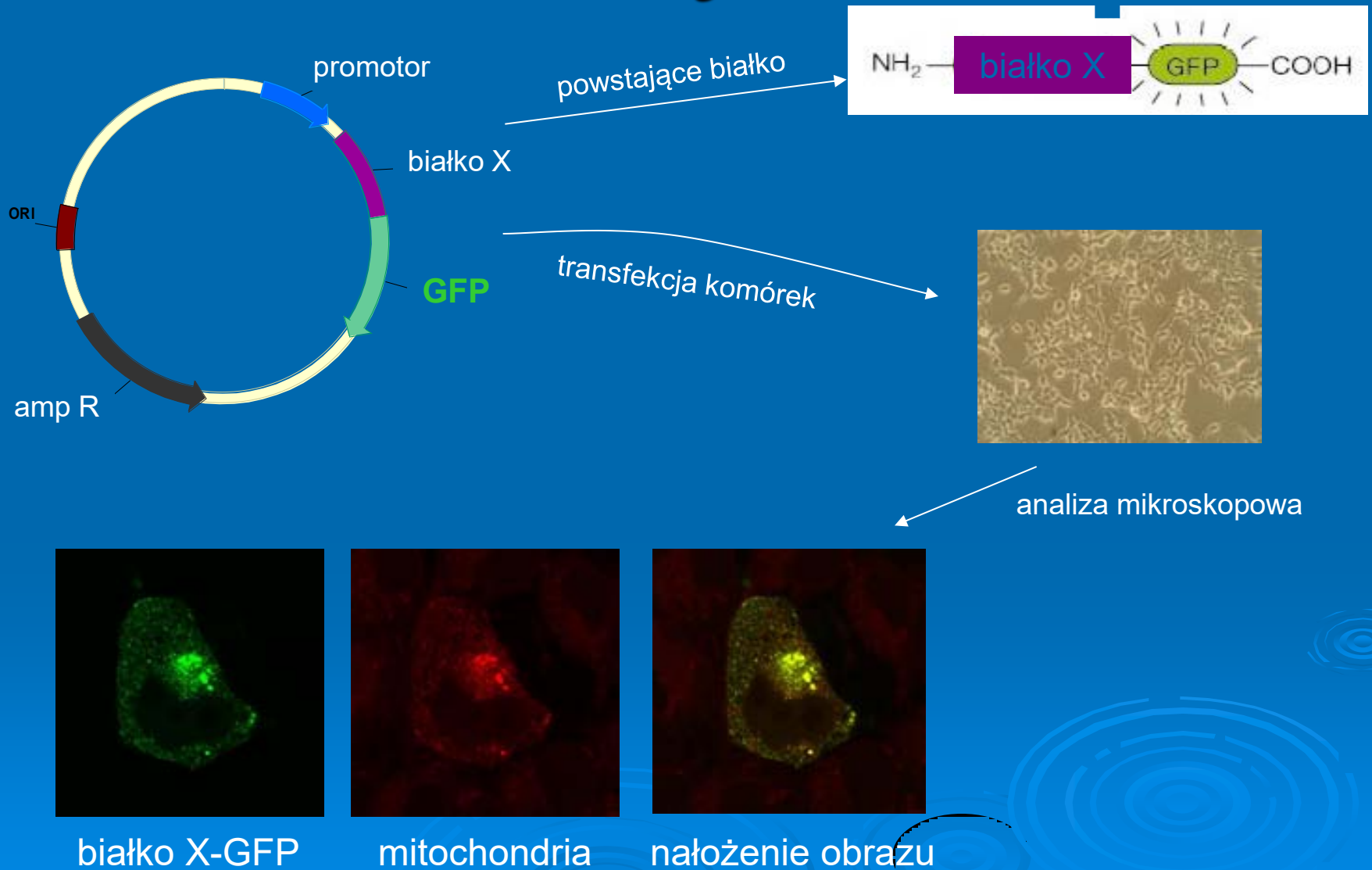
Przykładowe geny reporterowe

- β -galaktozydaza
- β -glukuronidaza (GUS)
- acetylotransferaza chloramfenikolu (CAT)
- fosfataza alkaliczna
- lucyferazy
- białko fluoryzujące na zielono (GFP)

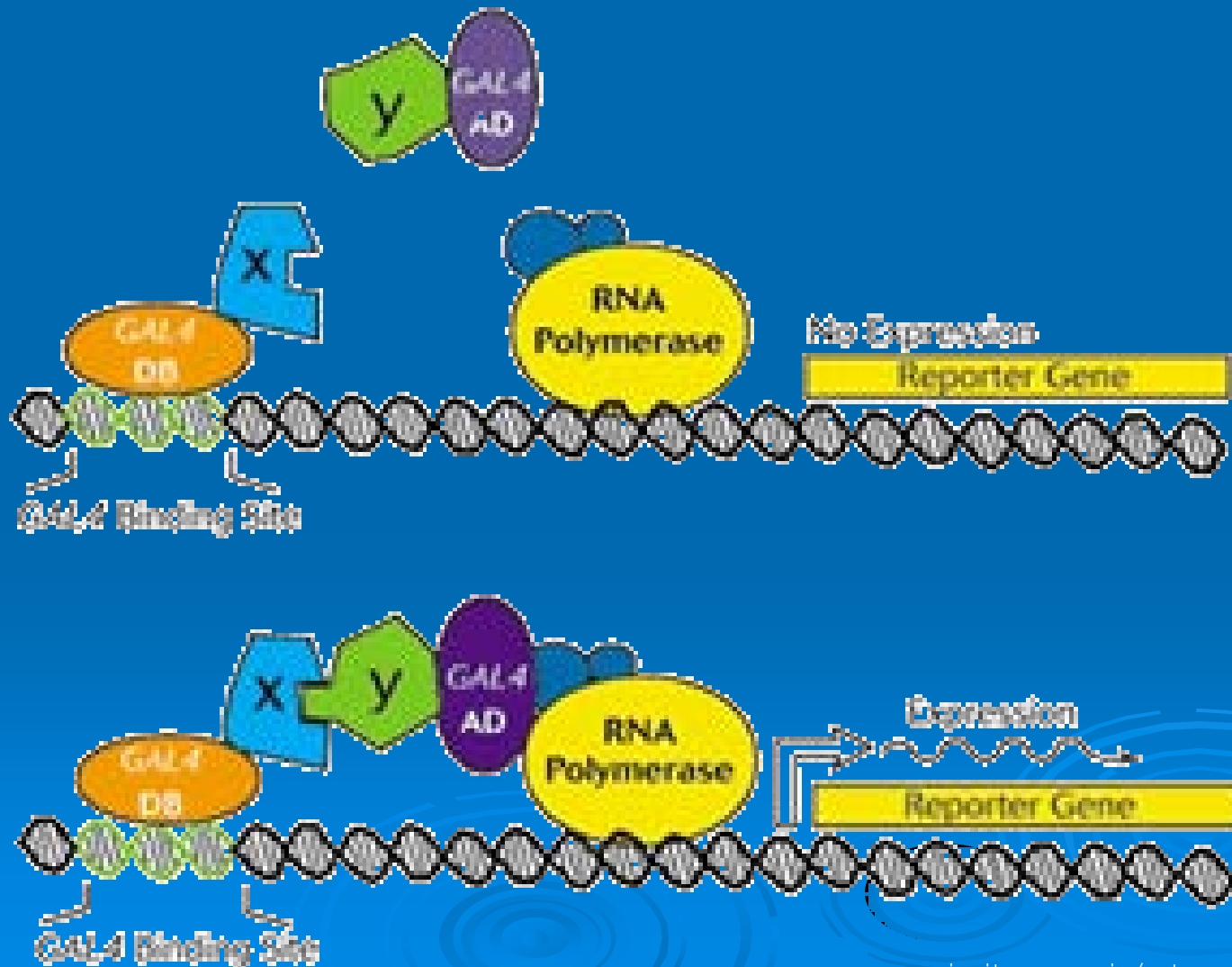
Identyfikacja regionów promotora odpowiedzialnych za regulację transkrypcji



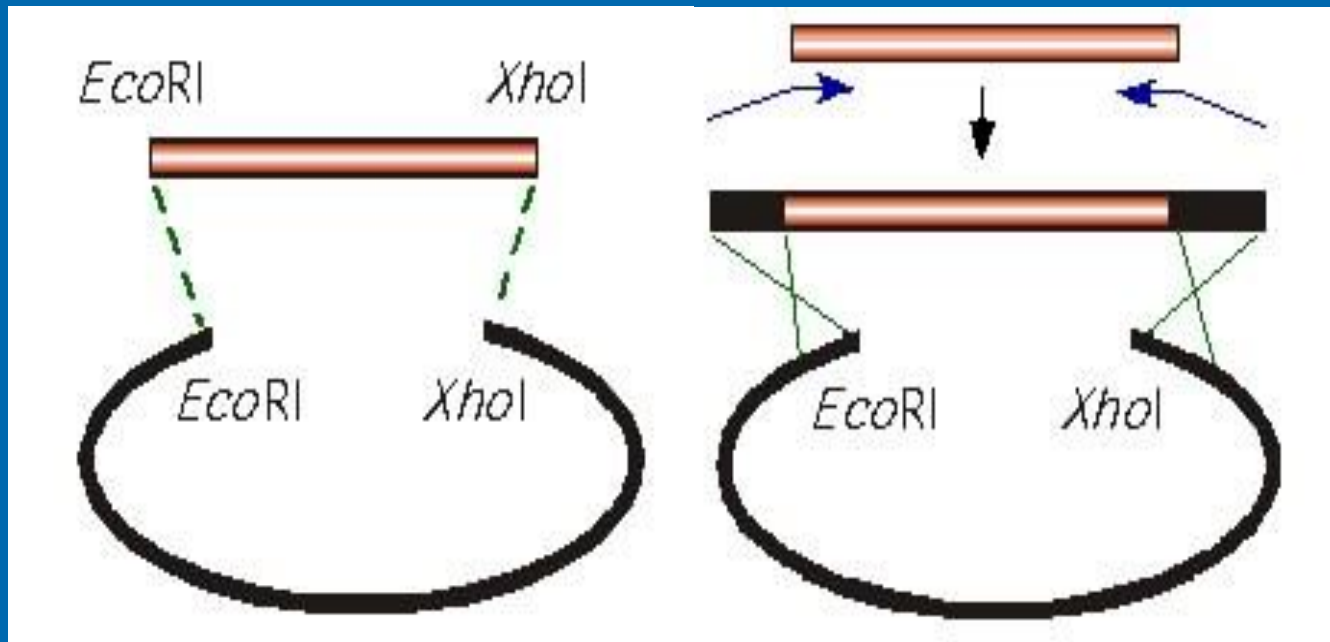
Lokalizacja białka



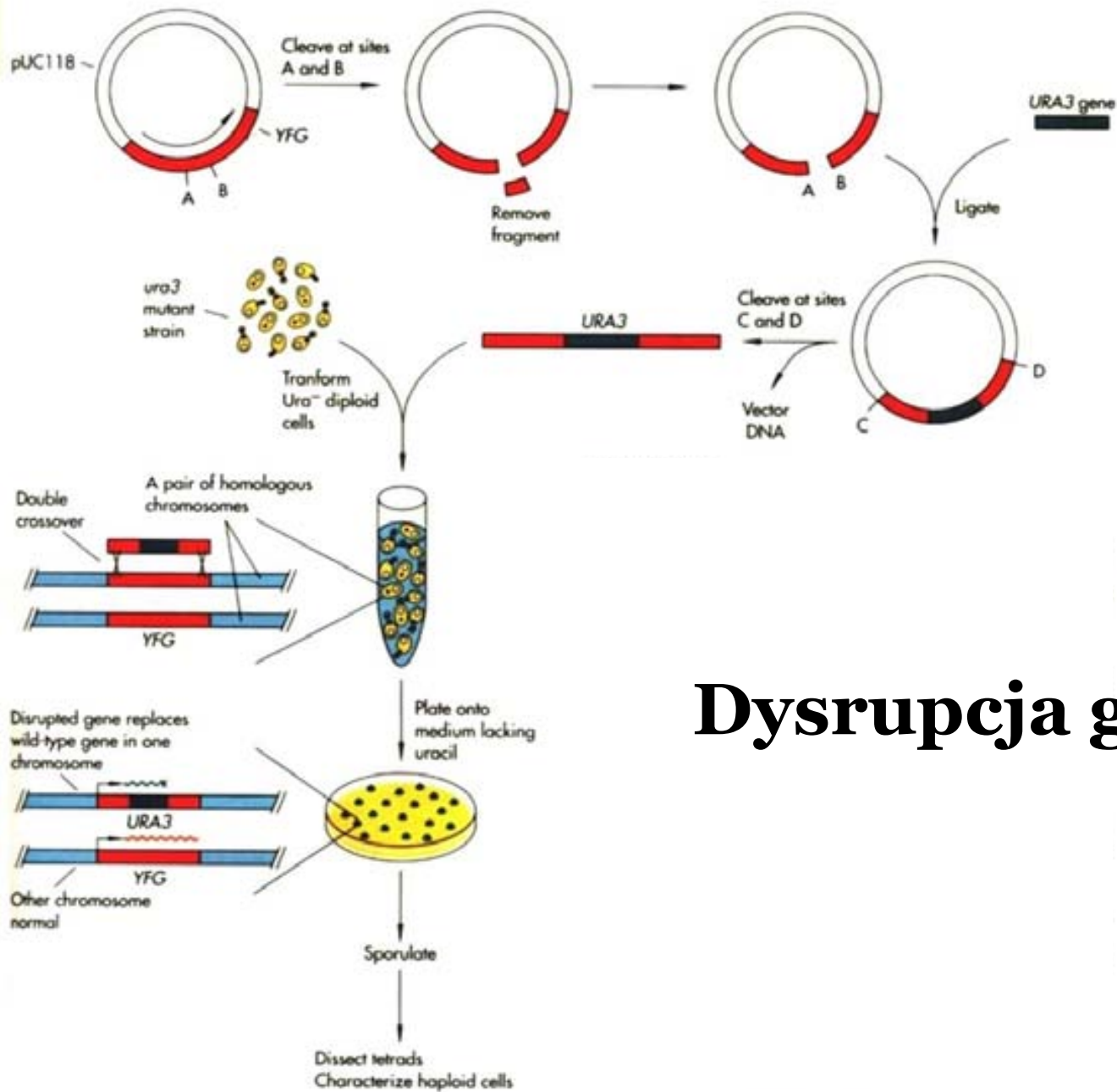
Drożdżowy system dwuhybrydowy: badanie interakcji pomiędzy białkami *in vivo*



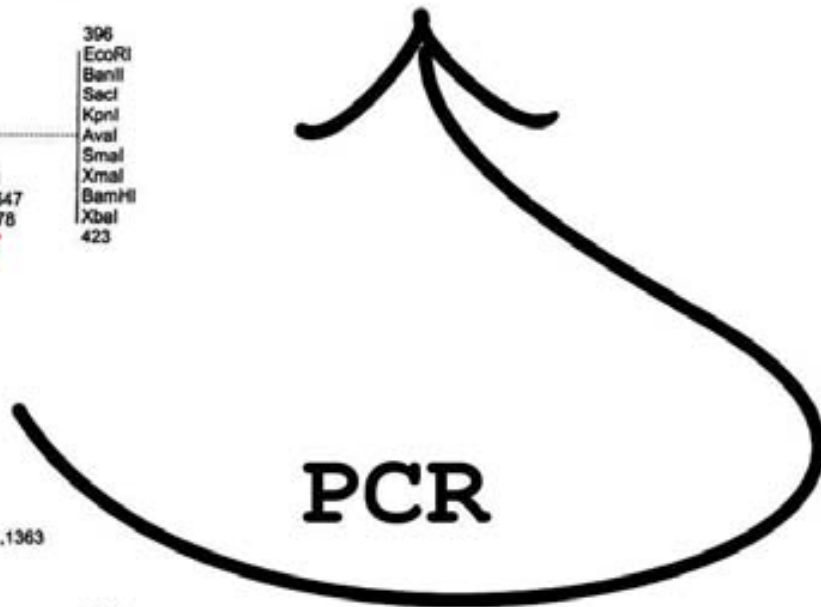
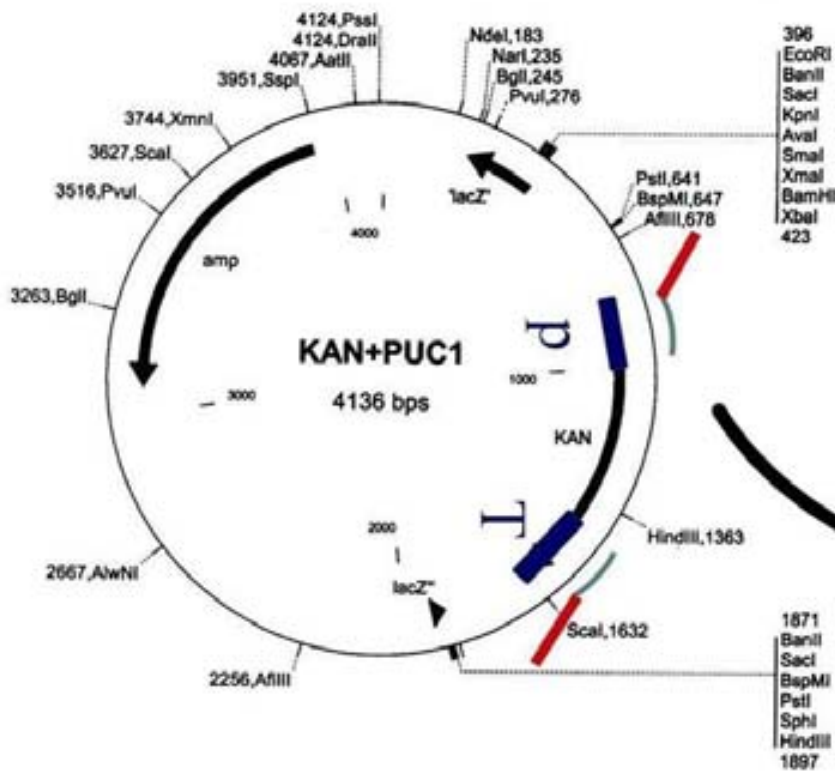
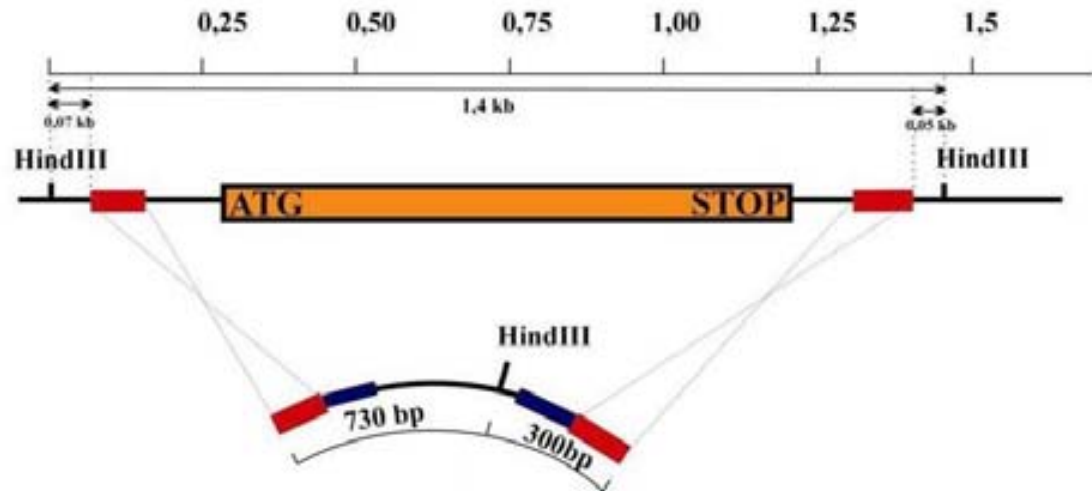
Klonowanie przez rekombinację

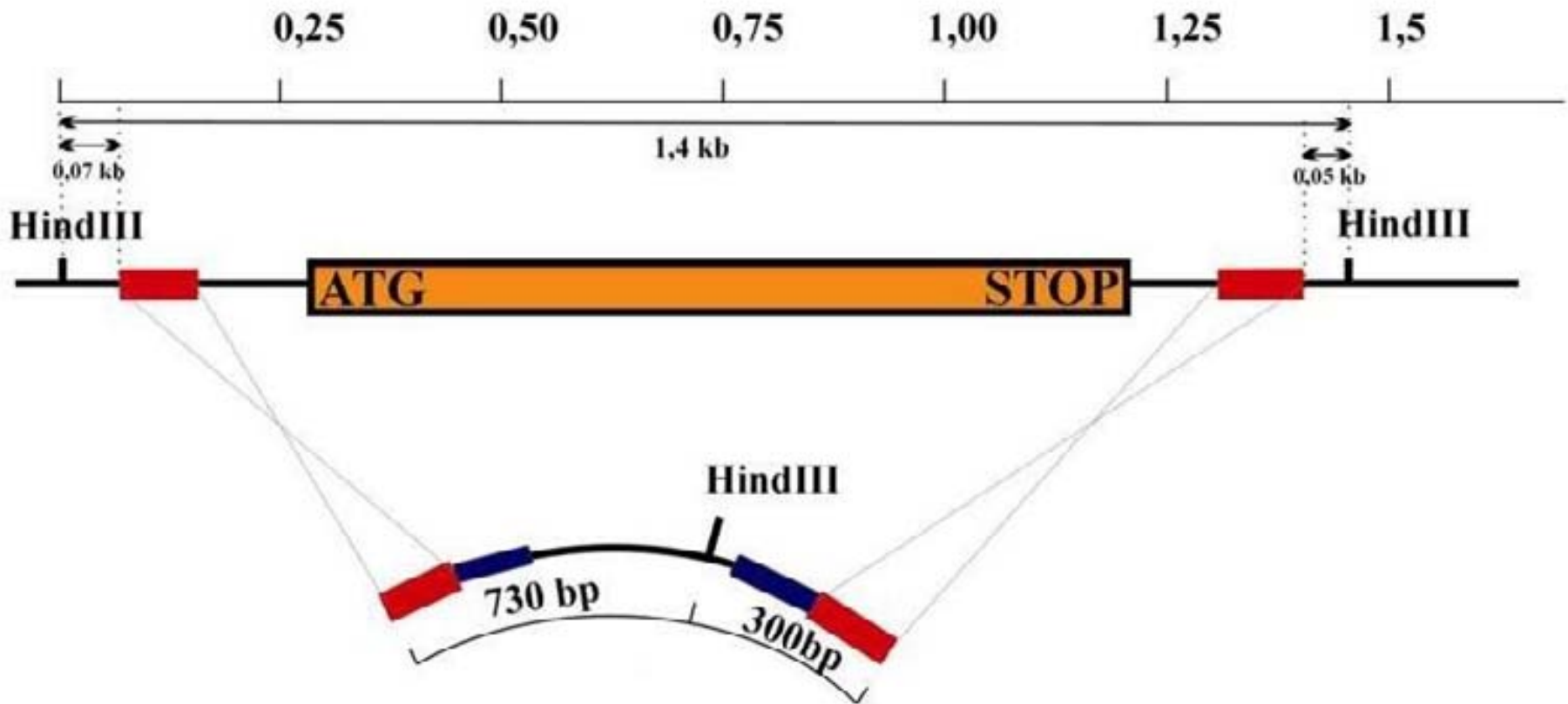


- 1 – „klasyczne” klonowanie: ligacja i transformacja *E. coli*, potem retransformacja do drożdży
- 2 – klonowanie produktu PCR z wykorzystaniem rekombinacji *in vivo* w drożdżach

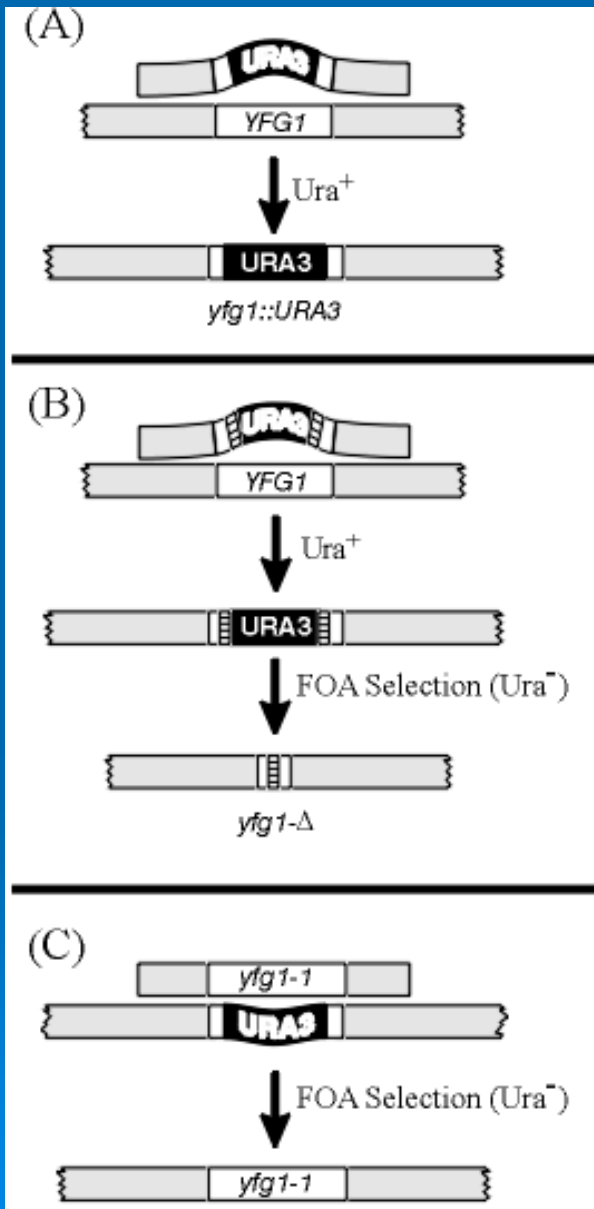


Dysrupcja genu





Manipulacje genetyczne w drożdżach



A) Delecja genu YFG1 (ang: *your favourite gene*) przez wstawienie kasety URA3 na drodze rekombinacji homologicznej.

Powstaje szczep *yfg1::URA3*

B) Delecja genu YFG1 przez wstawienie kasety URA3 oflankowanej sekwencjami niedrożdżowymi (np. bakteryjne *hisG*).

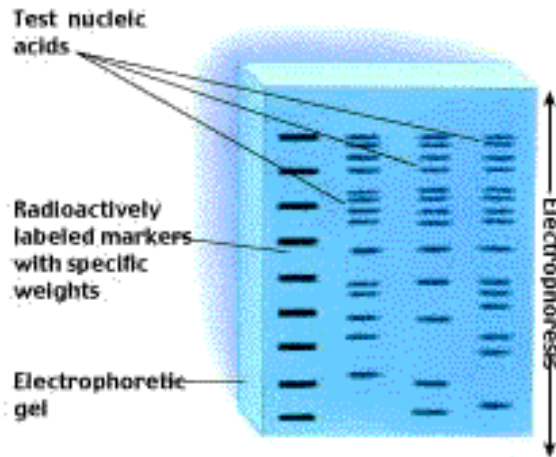
Drożdże stają się YFG⁻ URA⁺. Rekombinacja pomiędzy sekwencjami flankującymi kasetę prowadzi do wycięcia URA3.

Powstaje szczep - *yfg1-Δ*

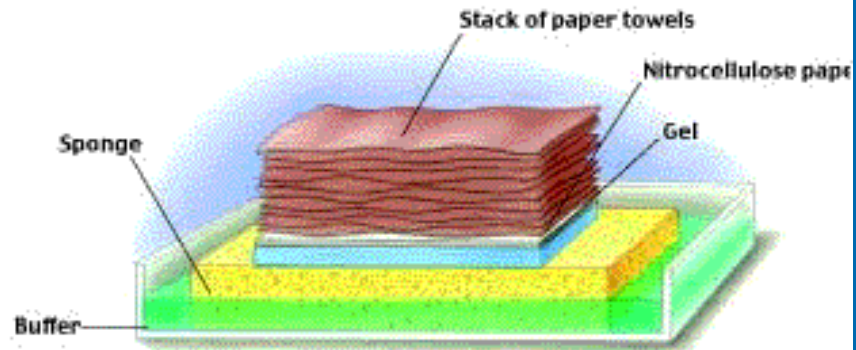
C) „Podstawienie” allelu *yfg1*. Zamiana zachodzi w szczepie *yfg1::URA3*, gen *URA3* zamieniany jest na zmutowaną kopię genu *yfg1*.

Powstaje szczep z mutacją *yfg1-1*.

Technika Southern blot:



1. Electrophoresis is performed, using radioactively labeled markers as a size guide in the first lane.



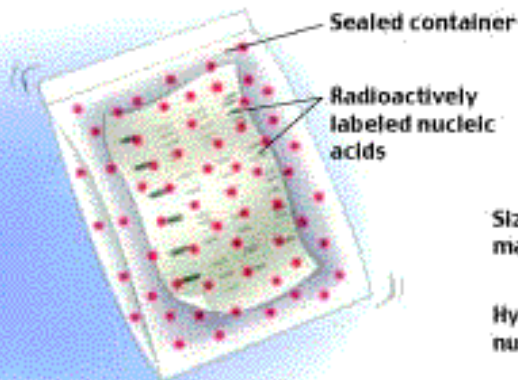
2. The gel is covered with a sheet of nitrocellulose and placed in a tray of buffer on top of a sponge. Alkaline chemicals in the buffer denature the DNA into single strands. The buffer wicks its way up through the gel and nitrocellulose into a stack of paper towels placed on top of the nitrocellulose.

Nitrocellulose paper now contains nucleic acid "print"

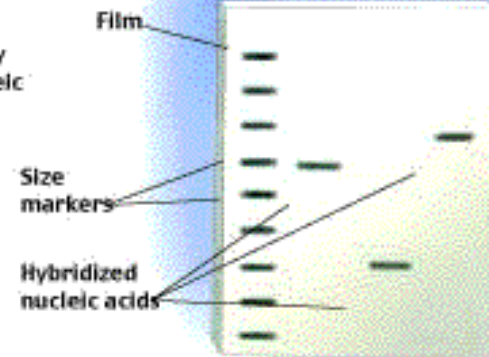
Gel



3. Pattern on gel is copied faithfully, or "blotted", onto the nitrocellulose.

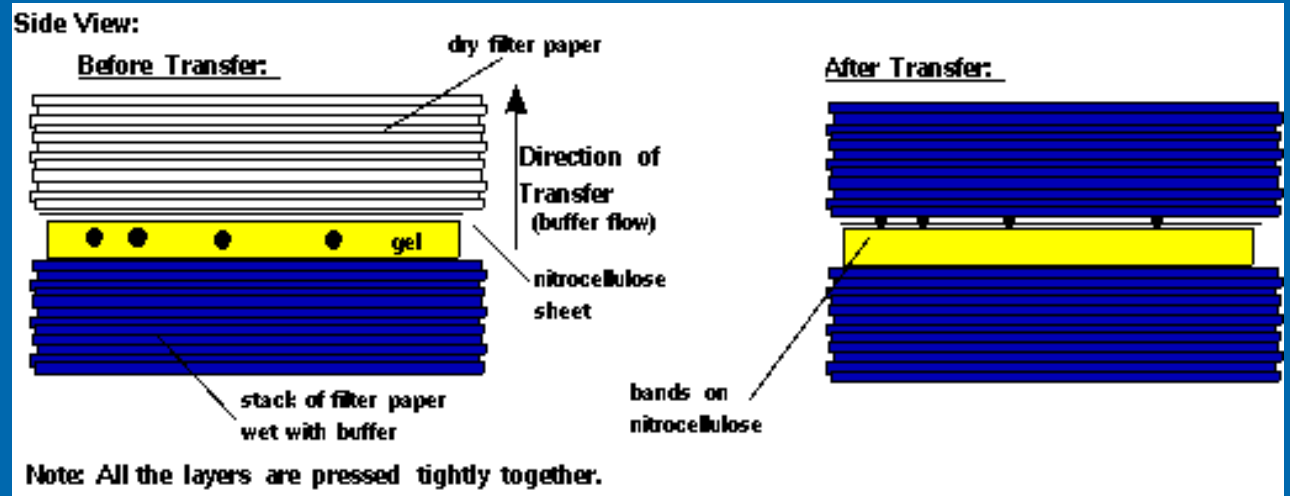


4. Blotted nitrocellulose is incubated with radioactively labeled nucleic acids, and then rinsed.

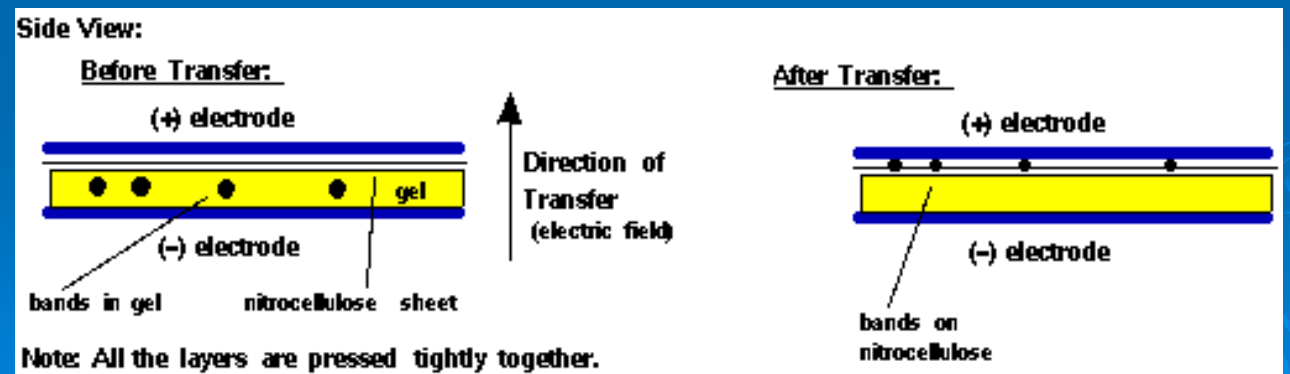


5. Photographic film is laid over the paper and is exposed only in areas that contain radioactivity (autoradiography). Nitrocellulose is examined for radioactive bands, indicating hybridization of the original nucleic acids to the radioactively labeled ones.

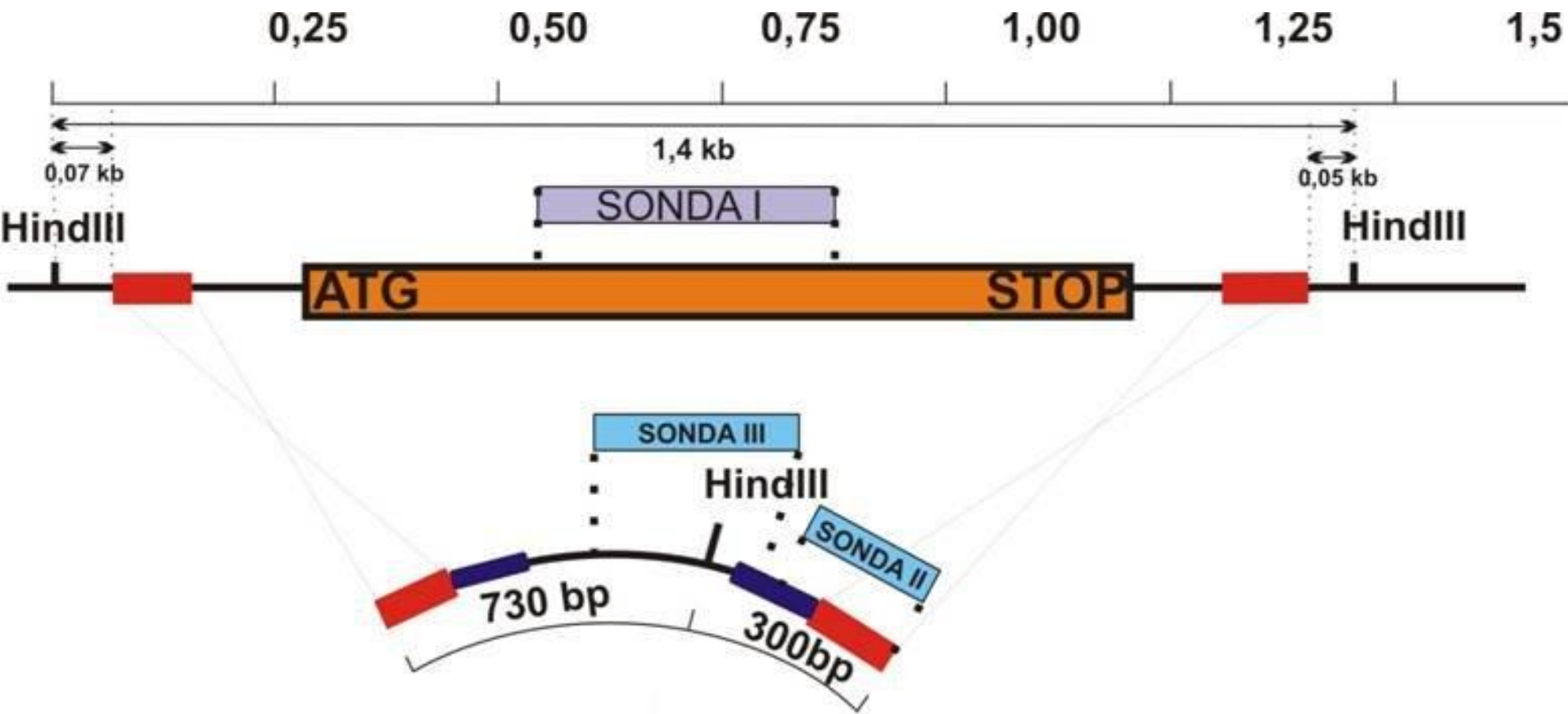
Transfer kapilarny



Transfer w polu elektrycznym



Kontrola dysrupcji przez hybrydyzację Southern



Analiza mutantów *A. nidulans*

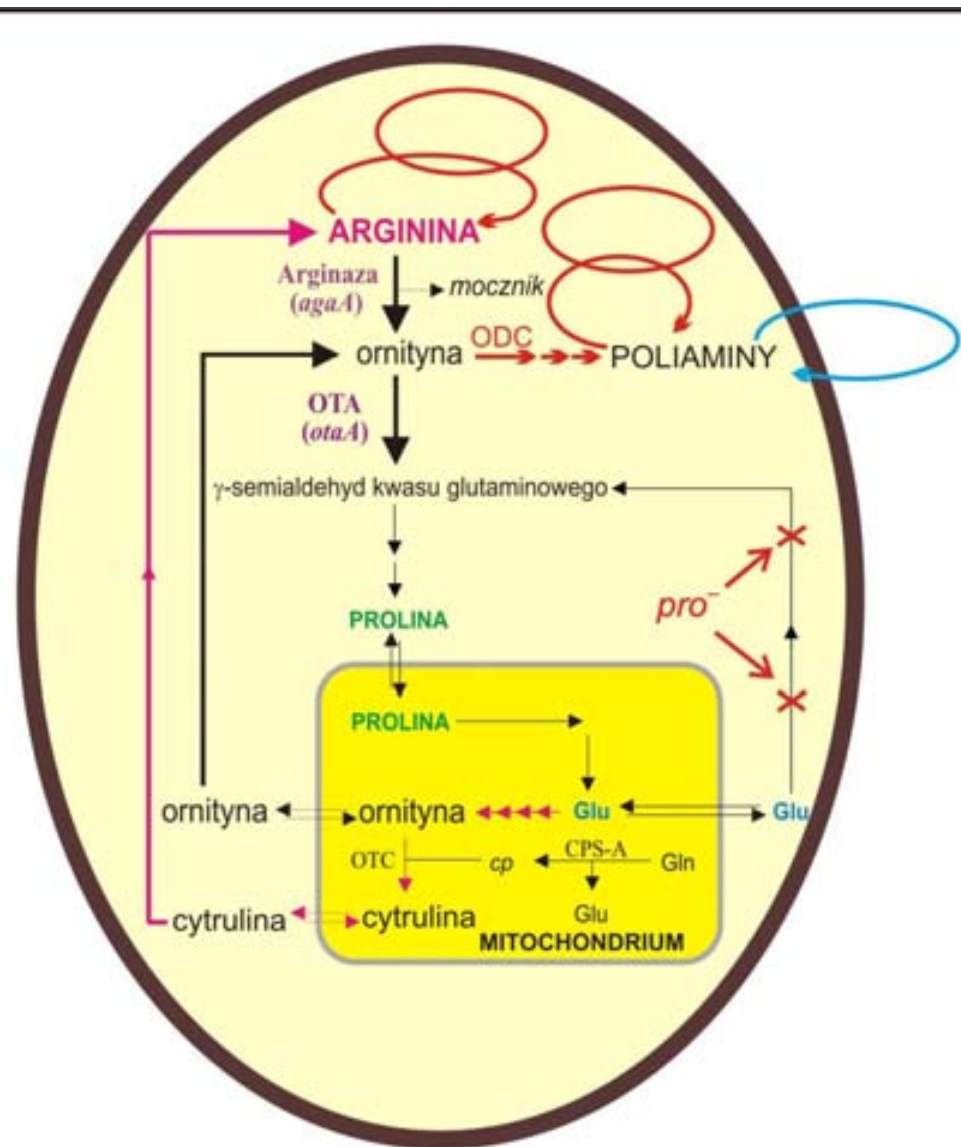
W wyniku mutagenozy dzikiego szczepu *A. nidulans* uzyskałeś dwa mutanty wymagające do wzrostu proliny. Mutacje okazały się recesywne. Każdego mutantu krzyżowano ze szczepem fenotypowo dzikim i uzyskano następujące askospory krzyżówkowe:

- dla mutantu nr 1: 50% dzikich i 50% pro-
- dla mutantu nr 2: 25% dzikich i 75% pro-

Zinterpretuj uzyskane wyniki.

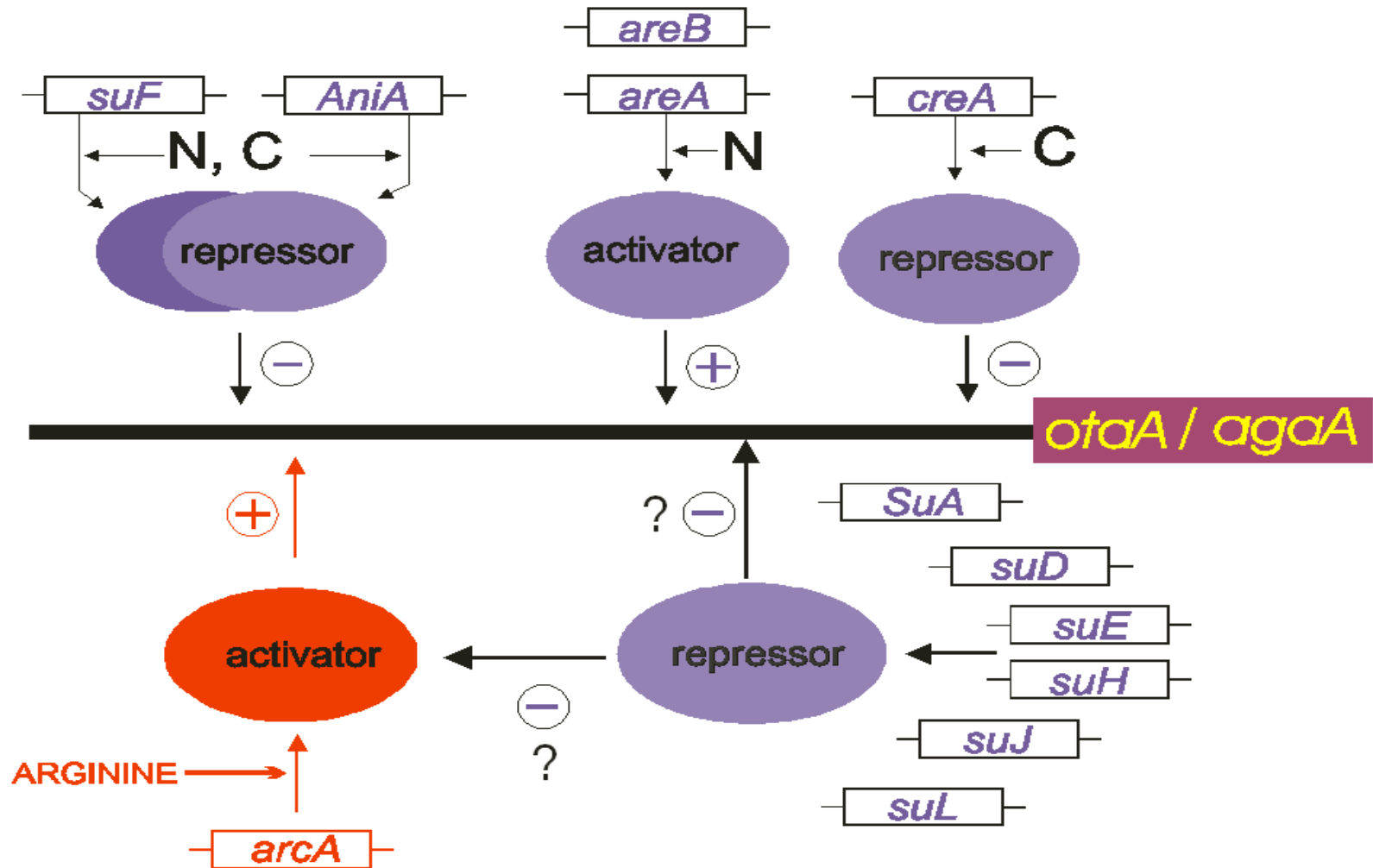
- Jak można by interpretować wyniki gdyby otrzymano następujący rozkład askospor krzyżówkowych: 75% dzikich i 25% pro-

Katabolizm argininy u *A. nidulans*; mechanizm supresji prolinowej

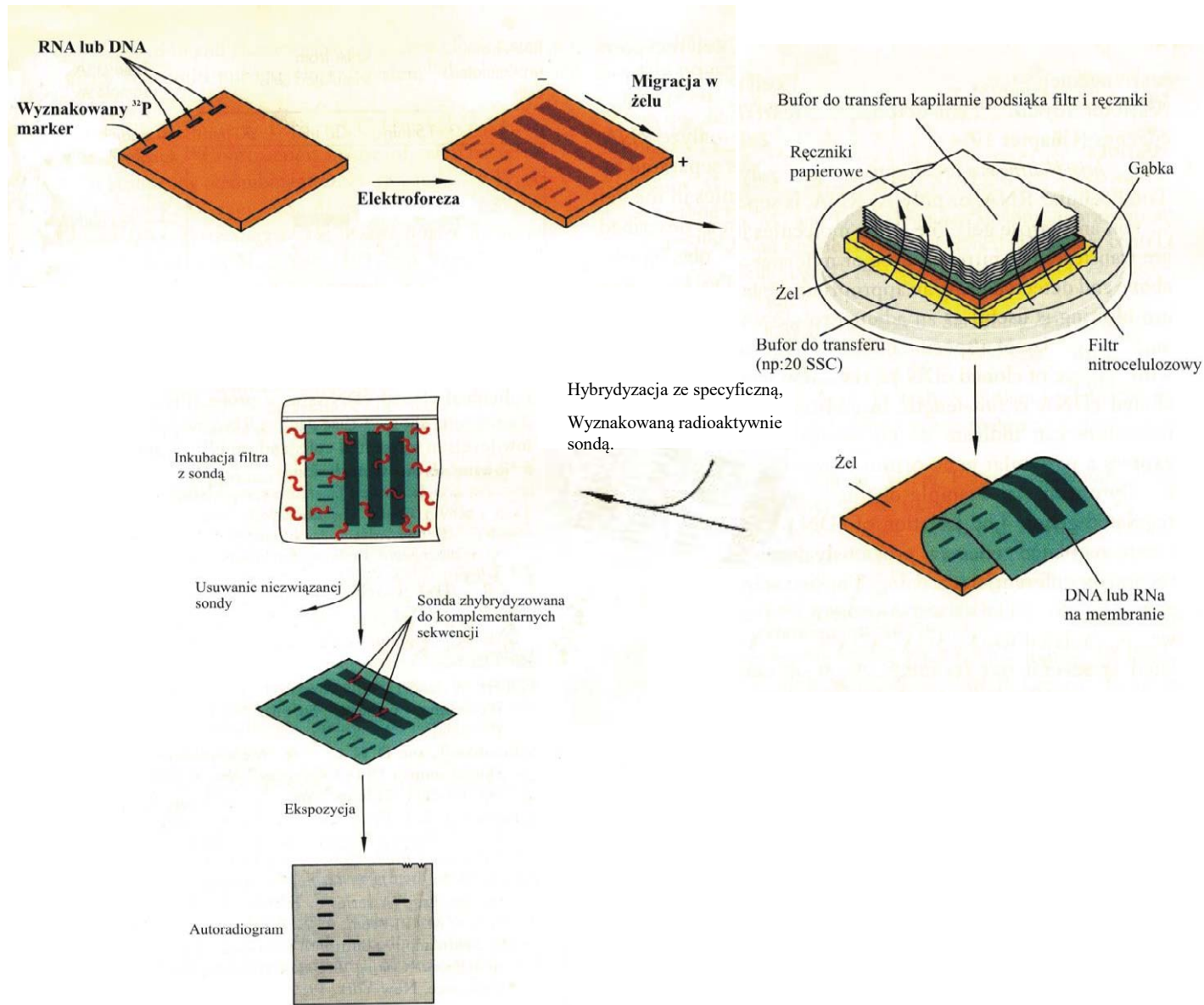


OTA - transaminaza ornitynowa
 ODC - dekarboksylaza ornitynowa
 OTC - karbamoilotransferaza ornitynowa
 CPS-A - syntetaza karbamoilofosforanowa
 cp - karbamoilofosforan
 Glu - kw. glutaminowy
 Gln - glutamina

Regulacja genów katabolizmu argininy u *A. nidulans*

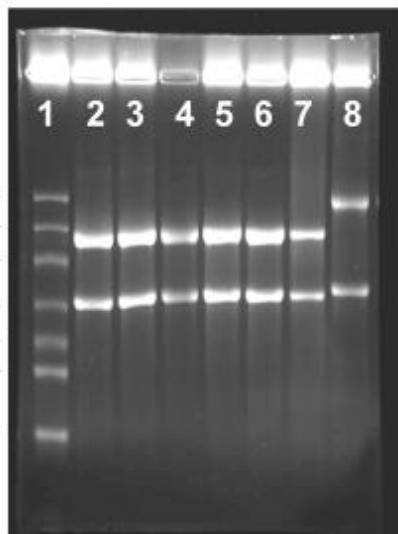


Technika *northern-blot*:

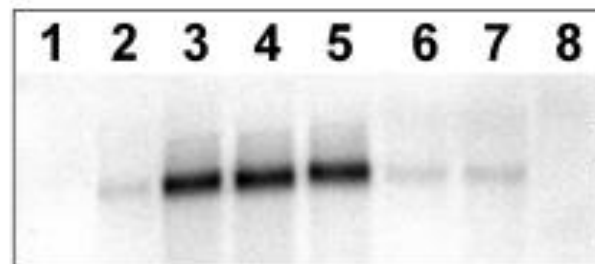


1.	standard masy cząsteczkowej RNA (RNA Lader High Range, MBI Fermentas)	warunki hodowli	aktywność arginazy
2.	wt	MM	0,2
3.	wt	MM + arginina	1,8
4.	<i>arcA^{d47}</i>	MM	1,9
5.	<i>arcA^{d47}</i>	MM + arginina	2,1
6.	<i>arcA^{r3}</i>	MM	0,1
7.	<i>arcA^{r3}</i>	MM + arginina	0,1
8.	RNA totalne z ludzkich komórek białaczkowych Jurkat	<i>Inu aktywności arginazy = aktywność enzymu dająca 1 μmol mocznika na minutę w warunkach standardowych</i>	

OBRAZ ELEKTROFOREZY



WYNIK AUTORADIOGRAFII



← sygnał hybrydyzacji dla mRNA arginazy (ok. 1300 zasad)