

JOANNA KAWA-RYGIELSKA

ZASTOSOWANIE METODY PCR DO RÓŻNICOWANIA DROŻDŻY PRZEMYSŁOWYCH

Streszczenie

Metoda PCR została wykorzystana do identyfikacji hybrydów drożdży przemysłowych rodzaju *Saccharomyces* z amyloolitycznym szczepem *Schwanniomyces occidentalis* ATCC 48086. Zastosowanie metody pozwoliło na identyfikację trzech fuzantów międzyrodzajowych posiadających fragmenty DNA wspólne dla obu szczepów wyjściowych.

Wstęp

Metoda PCR (Polimerase Chain Reaction) została opracowana przez Kary Mullis'a w 1987 r. Polega ona na powielaniu wybranego odcinka DNA *in vitro* w łańcuchowej reakcji polimeryzacji przy użyciu polimerazy i specyficznych primerów [7].

Metoda umożliwia milionowe zwielokrotnienie (amplifikację) w ciągu kilku godzin określonego fragmentu DNA lub RNA. Reakcję PCR przeprowadza się zwykle w 25 do 30 kolejno następujących po sobie jednakowych cyklach. W każdym cyklu wyodrębnić można trzy fazy, a mianowicie: denaturację, hybrydyzację i syntezę DNA.

Denaturacja – rozdzielenie dwuniciowych cząsteczek DNA na dwie pojedyncze nici w temperaturze 95°C.

Hybrydyzacja odcinków starterowych – przyłączenie primerów do miejsc homologicznych w badanym DNA zachodzące w temperaturze około 55°C do 80°C. Utworzona struktura jest sygnałem dla polimerazy DNA do powielenia tego regionu.

Synteza DNA – powielanie wybranego odcinka DNA *in vitro* w łańcuchowej reakcji polimeryzacji w temperaturze 75°C.

Kluczowe znaczenie dla całej reakcji ma termooporny enzym polimeraza DNA izolowany z bakterii *Thermus aquaticus*. Enzym ten zachowuje aktywność i zdolność polimeryzacji po wielokrotnym ogrzaniu do temp. 95°C (temperatura denaturacji dwułańcuchowego DNA). Reakcje PCR prowadzone są w przepływowych łaźniach

powietrznych (termocyklerach), a uzyskane produkty są rozdzielane elektroforetycznie na żelach agarozowych z bromkiem etydyny.

PCR jest metodą bardzo czułą. Teoretycznie możliwe jest wykazanie obecności nawet jednej cząsteczki DNA. W praktyce przyjmuje się jednak, że dolna granica czułości to kilkanaście cząsteczek w jednym mililitrze badanego roztworu. Dzięki zaletom (szybkość i czułość) PCR znajduje coraz szersze zastosowanie: w diagnostyce medycznej, weterynaryjnej, w badaniach kryminalistycznych [1] i w badaniach żywności [4].

Cel pracy

Celem pracy była identyfikacja hybrydów międzyrodzajowych szczepów drożdży przemysłowych rodzajów *Saccharomyces* z amylolitycznym szczepem *Schwanniomyces occidentalis* ATCC 48086 przy pomocy metody PCR.

Materiał i metody badań

Materiał badawczy stanowiły drożdże; *Saccharomyces cerevisiae* V30, *Saccharomyces diastaticus* ATCC 13006, *Schwanniomyces occidentalis* ATCC 48086, mieszańce z grupy S (*Saccharomyces diastaticus* ATCC 13006 x *Schwanniomyces occidentalis* ATCC 48086) oraz mieszańce z grupy R (*Saccharomyces cerevisiae* V30 x *Schwanniomyces occidentalis* ATCC 48086).

Badanie genomu hybrydów międzyrodzajowych metodą PCR

Matrycę DNA stanowił chromosomalny DNA badanych szczepów wyjściowych i mieszańców. Izolację DNA z komórek drożdżowych przeprowadzono wg metody Rose i wsp. [7] w modyfikacji Skąły [8]. Szczepy drożdży inkubowano w 10 cm³ pożywki YPG przez 12h w temp. 28°C z energicznym wytrząsaniem. Hodowlę wirowano (2000 obr./min. 4 min). Komórki zawieszono w 1 ml jałowej wody destylowanej i przeniesiono do probówki Eppendorfa. Zawiesinę wirowano (2000 obr./min. 1 min). Supernatant odrzucono, komórki zawieszono w 200 µl buforu do trawienia ściany komórkowej (β-merkaptoetanol – 1%, Tris-HCl-50 mM, EDTA (pH 7,5) – 25 mM, Zymolaza firmy Sigma – 5 mg/ml) i inkubowano przez 1 godzinę w temp. 37°C z okazyjnym wytrząsaniem. Dodano 200 µl roztworu do lizy (1% SDS; 0,2 M NaOH). Po wymieszaniu zawartość probówek inkubowano przez 30 min w temp. 65°C. Dodano 150 µl 5 M roztworu octanu potasu, roztwór inkubowano przez 30 min w lodzie po czym całość wirowano (14000 obr./min. 15 min, 4°C). Zebrano supernatant do nowej probówki i dodano 1 objętość zimnego (-20°C) izopropanolu, (obserwowano wytrącanie kwasów nukleinowych). Odwirowano wytrącone DNA (14000 obr./min. 5 do 10 min, 4°C), supernatant odrzucono. Osad przemyto 1 ml 70 % etanolu, wysuszono w suszarce

próżniowej z wirującym rotorem (Speedvac) firmy Savan i zawieszono w 50 μ l wody. Przechowywano w temp -20°C .

Amplifikację DNA przeprowadzono stosując primer mikrosatelitarny (GTG)₅ [6]. Syntezę primera wykonała na zamówienie niemiecka firma ARK.

Profil termiczny - PCR program (GTG)₅:

40 cykli:

93°C - 20 sek. (denaturacja dwuniciowego DNA),

50°C - 1 min (przyłączanie primera (GTG)₅),

72°C - 20 sek (powielanie homologicznych fragmentów DNA),

72°C - 6 min (powielanie DNA),

4°C - zakończenie reakcji PCR (chłodzenie).

Reakcje PCR wykonano z udziałem termostabilnej Taq polimerazy PCR firmy Quiagen oraz przy użyciu termocyklera DNA Engine PTC - 200 Peltier Thermal Cycler firmy MJ Research.

Elektroforeza DNA w żelu agarozowym

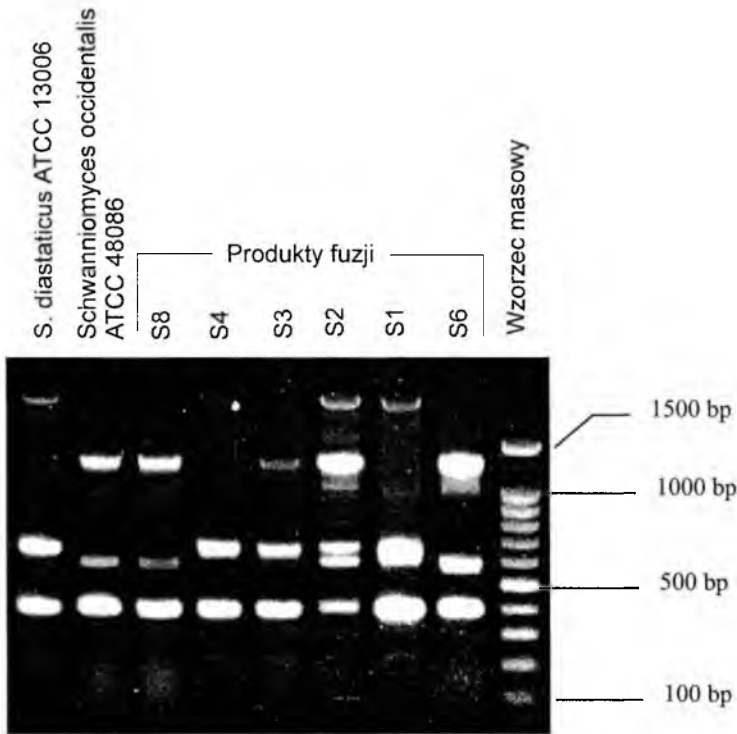
Produkty reakcji PCR oznaczono elektroforetycznie, stosując 0,8% żel agarozowy z bromkiem etydyny oraz markerem masy (100 bp DNA Ladder firmy Promega) o wielkości fragmentów 1500, 1000, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 200, 100 bp.

Rozdział DNA na żelu agarozowym rejestrowano przy pomocy telewizyjnego zestawu do rejestracji obrazu firmy Sony.

Wyniki i dyskusja

Analizując rozdział fragmentów DNA szczepów *Schwanniomyces occidentalis* ATCC 48086 i *Saccharomyces diastaticus* ATCC 13006 oraz ich mieszańców S1, S3, S4 S6, S8 (Rys. 1) stwierdzono, że jedynie dwa szczepy S2 i S3 mogły być uznane za fuzanty. Hybryd S2 zawierał dwa fragmenty DNA (ponad 1500 bp i 675 bp) stwierdzone również w szczepie rodzicielskim *Saccharomyces diastaticus* ATCC 13006 oraz dwa inne fragmenty (1300 bp i 600 bp) typowe dla drugiego rodzica *Schwanniomyces occidentalis* ATCC 48086. W odróżnieniu od fuzanta S2 fuzant S3 zawierał tylko po jednym regionie typowym dla każdego szczepu rodzicielskiego (675 bp) odpowiadający *Saccharomyces diastaticus* 13006 i (1300 bp) typowy dla *Schwanniomyces occidentalis* ATCC 48086. Ponadto w obu hybrydach stwierdzono obecność jednego fragmentu DNA o wielkości 400 bp występującego u obu szczepów rodzicielskich. Jednoznaczne stwierdzenie, od którego z rodziców pochodzi ten fragment, wymagałoby dalszych analiz. Pozostałe produkty fuzji szczepów *Saccharomyces diastaticus* 13006 i *Schwanniomyces occidentalis* ATCC 48086, posiadały fragmenty DNA identyczne z

jednym z partnerów fuzji i tak mieszańce S8 i S6 z *Schwanniomyces* a S1 i S4 z *Saccharomyces*, (Rys. 1).



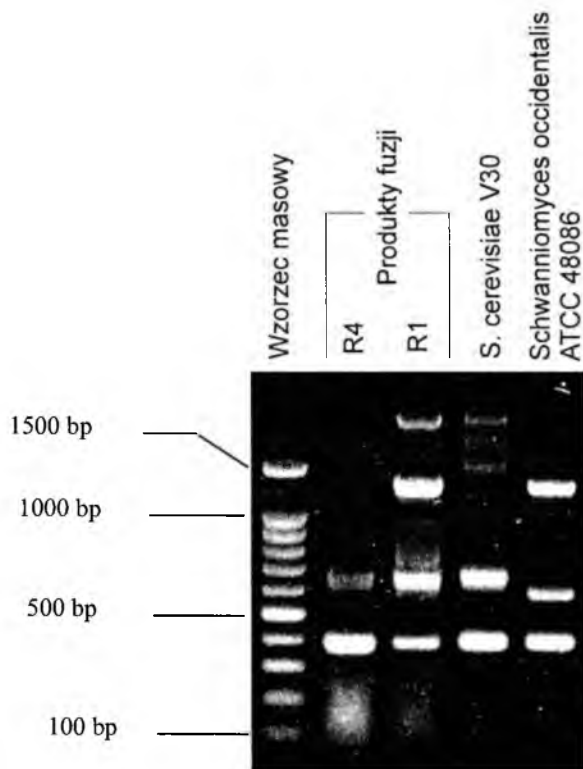
Rys. 1. Produkty reakcji PCR uzyskane przy użyciu primera $(GTG)_5$ dla szczepów rodzicielskich *Saccharomyces diastaticus* ATCC 13006 i *Schwanniomyces occidentalis* ATCC 48086 oraz produktów ich fuzji.

Fig. 1. Fingerprinting of PCR products obtained for parental strains (*Saccharomyces diastaticus* ATCC 13006 and *Schwanniomyces occidentalis* ATCC 48086) and their fusants by use of $(GTG)_5$ primer.

Wśród mieszańców R (*Saccharomyces cerevisiae* V30 x *Schwanniomyces occidentalis* ATCC 48086) zidentyfikowano obecność tylko jednego fuzanta. Hybryd R1 posiadał dwa fragmenty DNA (ponad 1500 bp i 675 bp) typowe dla szczepu *Saccharomyces cerevisiae* rasy V30 oraz jeden region (1300 bp) identyczny z drugim partnerem fuzji (Rys. 2). Hybryd wyróżniał się przewagą fragmentów DNA typowych dla szczepu wyjściowego z rodzaju *Saccharomyces*. Podobnie jak we wcześniej omawianych przypadkach fuzant R1 posiadał 1 fragment o wielkości 400 bp, wspólny dla obu szczepów wyjściowych. Produkty amplifikacji genomowego DNA mieszańca R4 były

charakterystyczne tylko dla jednego szczepu wyjściowego, a mianowicie dla *Saccharomyces cerevisiae* rasy V30.

Podsumowując należy stwierdzić, iż zastosowanie metody PCR i primera mikrosatelitarnego (GTG)₅ pozwoliło na zróżnicowanie partnerów fuzji w obrębie rodzaju *Schwanniomyces* i *Saccharomyces* oraz potwierdzono obecność 3 hybrydów międzyrodzajowych tych szczepów S2, S3, R1, posiadających fragmenty DNA typowe dla obu form rodzicielskich. Analiza wybranych regionów DNA pozostałych mieszańców nie potwierdziła przypuszczeń, że są one produktami fuzji szczepów *Saccharomyces* i *Schwanniomyces*. U mieszańców S8 i S6 znaleziono wyłącznie fragmenty charakterystyczne dla *Schwanniomyces occidentalis* ATCC 48086, a dla S1, S4, R4, wyłącznie fragmenty typowe dla rodzaju *Saccharomyces*. Istnieje możliwość, że do selektywnej



Rys. 2. Produkty reakcji PCR uzyskane przy użyciu primera (GTG)₅ dla szczepów rodzicielskich *Saccharomyces cerevisiae* V30 i *Schwanniomyces occidentalis* ATCC 48086 oraz produktów ich fuzji.

Fig. 2. Fingerprinting of PCR products obtained for parental strains (*Saccharomyces cerevisiae* V30 and *Schwanniomyces occidentalis* ATCC 48086) and their fusants by use of (GTG)₅ primer.

amplifikacji nie udało się wybrać takich regionów DNA, które byłyby wspólne dla obu szczepów wyjściowych. Ponadto, w czasie łączenia protoplastów drożdży *Saccharomyces* i *Schwanniomyces* mogło dochodzić do tworzenia tzw. „produktów ubocznych” fuzji, których genom może składać się z kompletu chromosomów jednego ze szczepów wyjściowych oraz pojedynczego chromosomu drugiego rodzica [9].

Użyteczność primerów mikrosatelitarnych prezentowano we wcześniejszych pracach wielu badaczy. Couto i wsp., [2, 3] wykazali szczególną przydatność primera mikrosatelitarnego (GTG)₅ umożliwiającego różnicowanie wewnątrzgatunkowe szczepów. Inni badacze z dużym powodzeniem stosowali primery mikrosatelitarne do różnicowania szczepów w obrębie rodzajów *Saccharomyces* a *Kluyveromyces* [5] czy *Debariomyces hansenii*, *Candida zeylanoides* [6].

Wnioski

1. Analiza elektroforetyczna produktów PCR, uzyskanych przy użyciu primera mikrosatelitarnego (GTG)₅, pozwoliła na różnicowanie szczepów rodzicielskich, w obrębie rodzaju *Saccharomyces* i *Schwanniomyces occidentalis* ATCC 48086 oraz na identyfikację trzech hybrydów międzyrodzajowych tych szczepów.
2. Spośród potwierdzonych genetycznie fuzantów (S2, S3, R1) na szczególną uwagę zasługuje szczep S2 wykazujący największą ilość fragmentów DNA pochodzących od obu szczepów rodzicielskich.

LITERATURA

- [1] Chmiel A: Biotechnologia - podstawy mikrobiologiczne i biochemiczne. Wyd. Nauk. PWN, Warszawa, 1998, 239-243.
- [2] Couto M., Eijmsa B., Hofstra H.: Evaluation of molecular Typing to assing genetic diversity among *Saccharomyces cerevisiae* strains, Appl. Envir. Microb., **1**, 1996, 41-46.
- [3] Couto M., Hartog J., Hofstra H., van der Vossen J.: Identification of spoilage yeast in a food- production chain by microsatellite polymeraes chain reaction fingerprinting, Food Microb., **13**, 1996, 59-67.
- [4] Kur J.: Szybka diagnostyka mikrobiologiczna zanieczyszczenia żywności, w: Postępy w technologii i chemii żywności, Mat. XXVIII Sesji Nauk. KTiChŻ PAN, 1997, 1.
- [5] Lieckfeldt E., Meyer W., Bomer T.: Rapid identification and differentiation of yeasts by DNA and PCR fingerprinting, J. Basic Microbal. **33** (6), 1993, 413-426.
- [6] Romano A., Casaregola S., Torre P, Gaillardin C.: Use of RAPD and mitochondrial DNA RFLP for typing of *Candida zeylanoides* and *Debariomyces hansenii* yeast strains isolated from cheese, System. Appl. Microbiol., **19**, 1996, 155-264.
- [7] Rose M.D., Winston F., Hieter P.: Methods in yeast genetics. A laboratory course manual., Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1990.
- [8] Skała J.: Informacje personalne, 1998.
- [9] Tamaki H.: Genetic properties of abortive products resulting from the protoplast fusion in yeast, Mol. Gen. Genet, **187**, 1982, 177-179.

APPLICATION OF PCR METHOD TO DIFFERENTIATION OF INDUSTRIAL YEAST**S u m m a r y**

PCR method was used for identification hybrids industrial yeast *Saccharomyces* with amylolytic strain *Schwanniomyces occidentalis* ATCC 48086. Application of this method afforded possibilities for identification of three intergeneric fusants containing DNA both parental strains. ☒