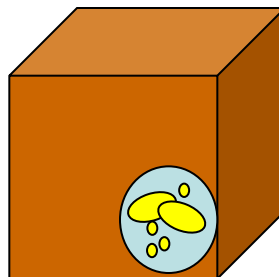


# MOLEKULÁRNĚ BIOLOGICKÉ METODY V ENVIRONMENTÁLNÍ MIKROBIOLOGII

Martina Nováková, VŠCHT Praha

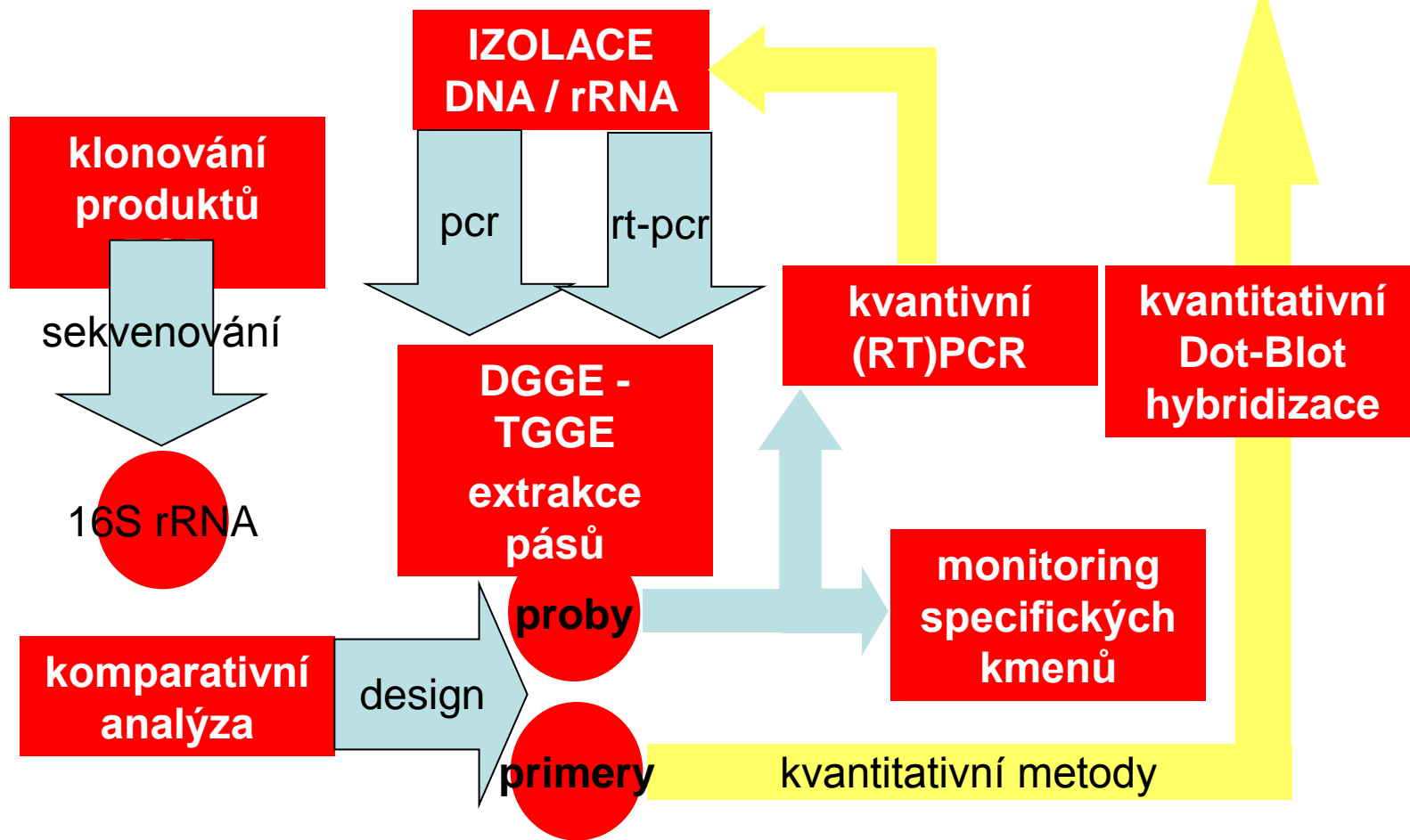


# MOLEKULÁRNÍ BIOLOGIE V BIOREMEDIACÍCH



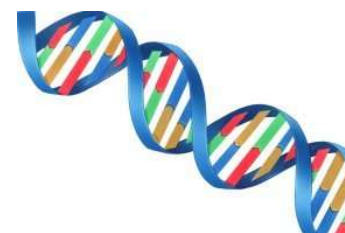
enumerace

**FISH**  
průtoková  
cytometrie



# METODY PRO IDENTIFIKACI A DETEKCI MIKROORGANISMŮ

- Tradiční metody:
  - kulturační
  - mikroskopické
  - imunochemické
- Molekulárně biologické



# MOLEKULÁRNĚ BIOLOGICKÉ METODY

- Nezávislé na kultivaci mikroorganismů (0,1 – 1 % MO je kultivovatelných klasickými kultivačními technikami)

- Studium:

- DNA
  - RNA
  - mastných kyselin
  - specifických proteinů
- } nejčastější



Extrakce a izolace

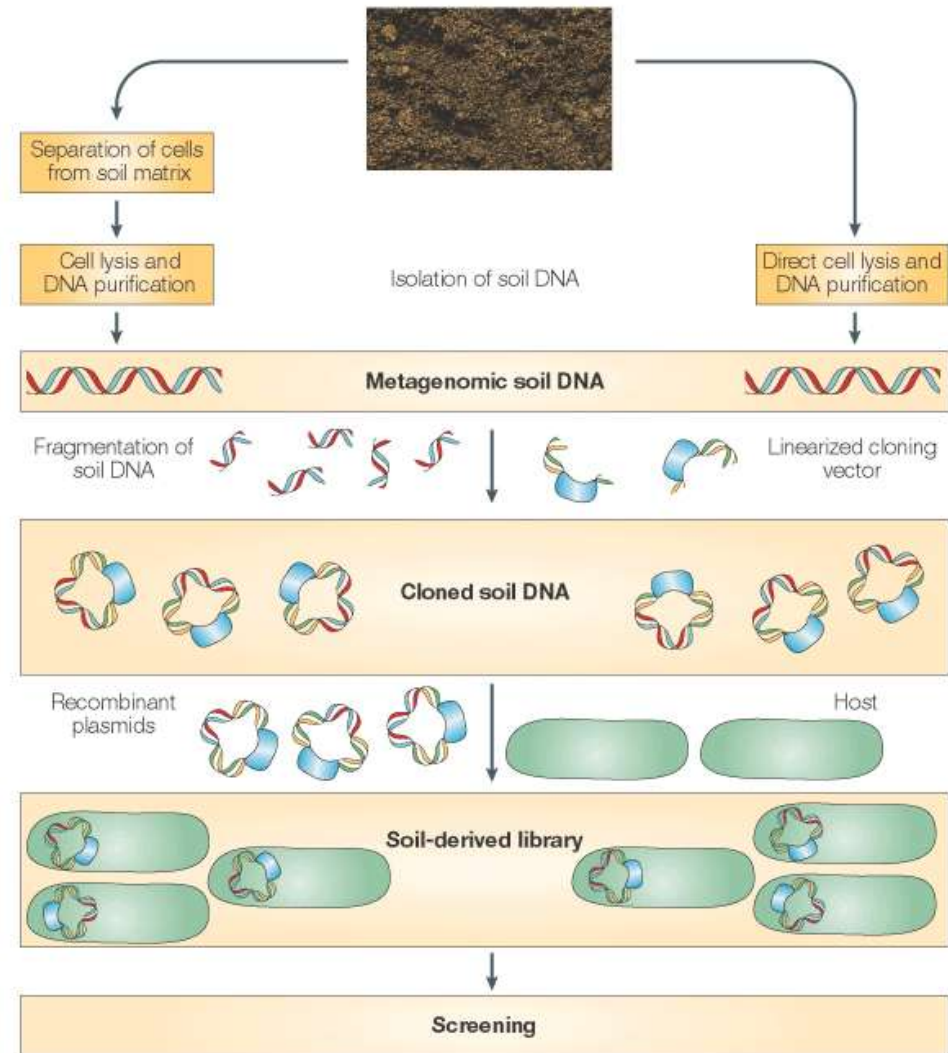
Purifikace

Molekulárně-biologická  
analýza



# METAGENOMIKA

- environmentální genomika
- relativně nový obor
- analýza vzorků DNA získaných přímo z prostředí



# Extrakce a izolace nukleových kyselin

**DNA** - fylogenetické nebo „funkční“ informace o aktivní i neaktivní mikroflóře  
**rRNA** - sledování nejaktivnější populace

## Extrakční postup



```
graph TD; A[Extrakční postup] --> B[Frakcionace buněk]; A --> C[Přímá lyze celého vzorku (rušivé složky prostředí)];
```

### Frakcionace buněk

- oddělení buněk od zbytku půdy nebo jiné matrice před jejich lyzí

- pracnější a časově náročnější

### Přímá lyze celého vzorku (rušivé složky prostředí)

- získá se DNA z 90 až 99% buněk
- využívají ji komerčně dostupné soupravy (kity)

# Extrakce a izolace nukleových kyselin

## 1) buněčná lyze:

---

### Chemicky

- alkalické fosfátové pufry (pH8)
- EDTA (inhibice nukleas), SDS (rozrušení buněčných membrán), chloroform (destabilizace membrán), polyvinylpolypyrrolidon (odstranění huminových kyselin) ...

### Enzymaticky

- lysozym (rozrušení buněčné stěny), proteinasa K (inaktivace DNAs a RNAs), DNAsy, RNAsy

### Fyzikálně

- zahřátí na 80°C, opakované zmrazování a tání nebo tzv. bead-beating

---

## 2) odstranění buněčných struktur včetně cukerných složek a proteinů

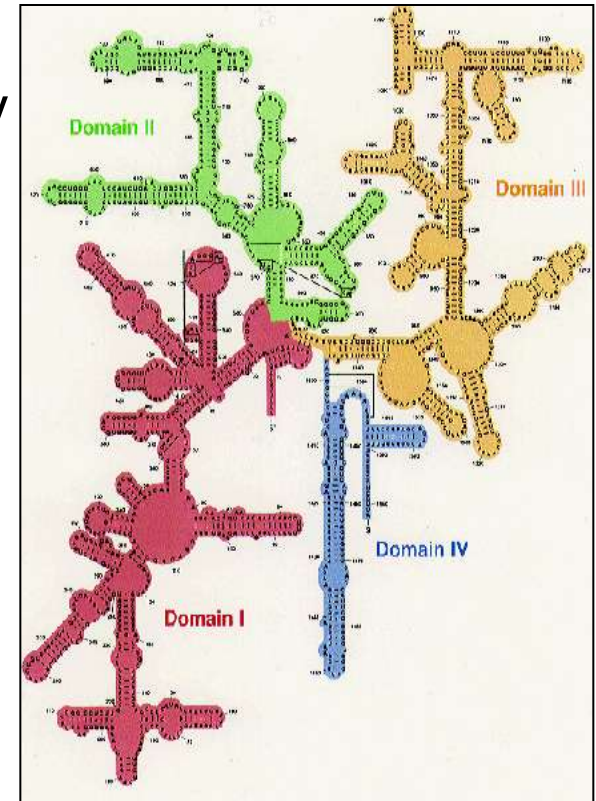
---





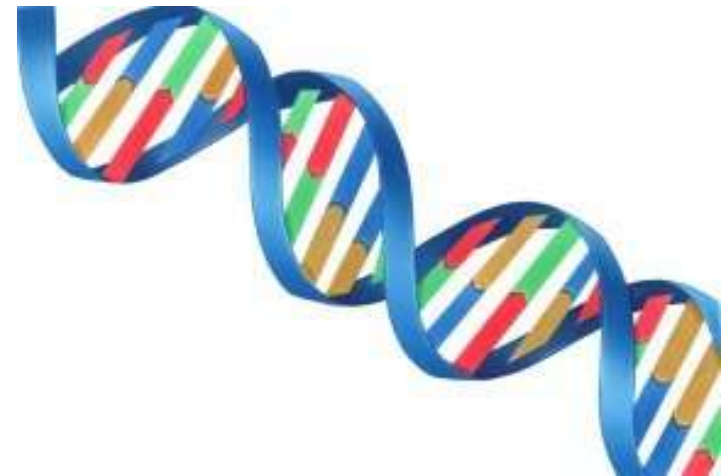
# MIKROBIÁLNÍ DIVERSITA

- **16S rRNA** = ukazatel mikrobiální diversity  
= část malé ribozomální podjednotky
- Molekulární „chronometr“
  - univerzální molekula!
  - funkčně homologní
  - obsahuje vysoce konzervativní úseky
  - variabilní sekvence - reflektují evoluční změny

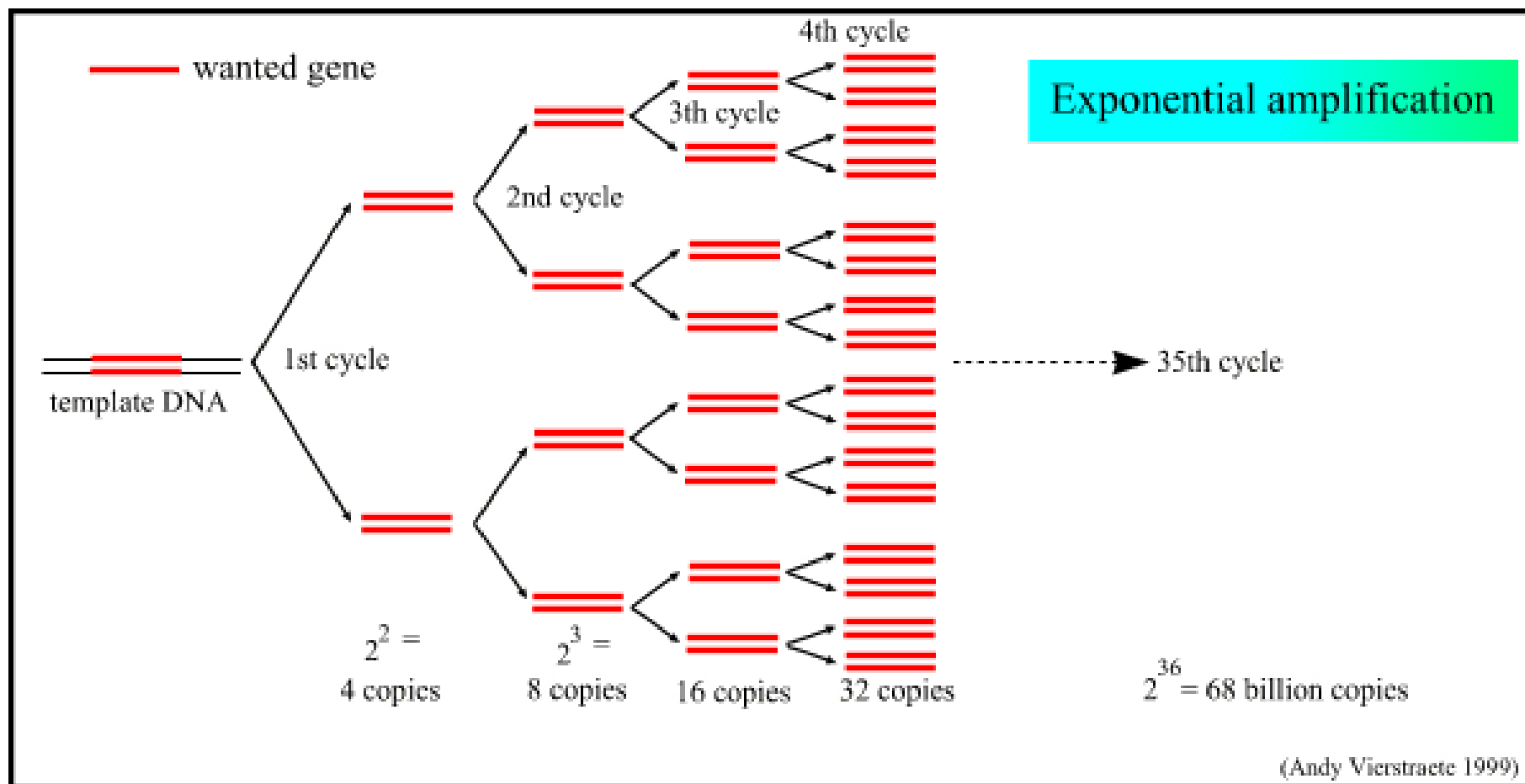


# Molekulárně biologické metody

- Sekvenace nukleových kyselin
- Genové próby (FISH, RSGP,...)
- Štěpení restrikcními enzymy
- ARDRA
- RFLP, T-RFLP
- SSCP
- Reasociace DNA
- LMW RNA anlyza
- DGGE, TGGE, TTGE
- ...



# PCR - polymerasová řetězová reakce



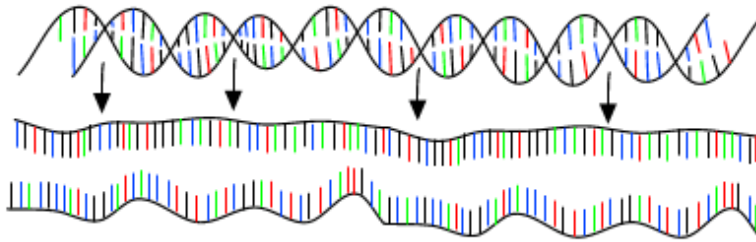
# PCR - polymerasová řetězová reakce

## PCR : Polymerase Chain Reaction

30 - 40 cycles of 3 steps :

### Step 1 : denaturation

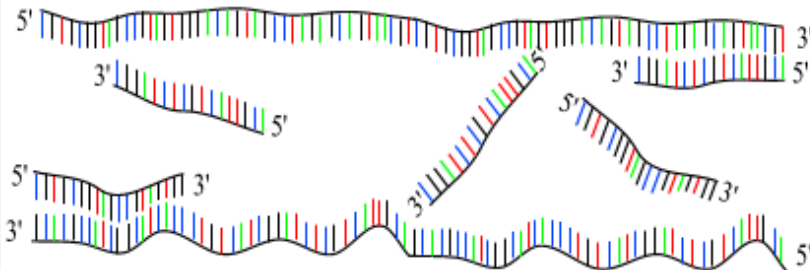
1 minut 94 °C



### Step 2 : annealing

45 seconds 54 °C

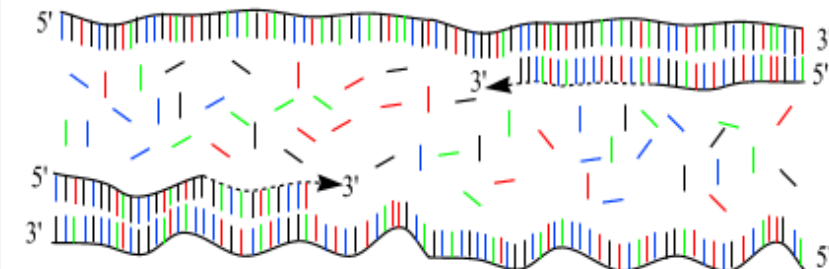
forward and reverse primers !!!



### Step 3 : extension

2 minutes 72 °C

only dNTP's



(Andy Vierstraete 1999)

### Denaturace

- 94°C

### Annealing

- Připojení primerů

- Teplota dle primerů

### Extenze

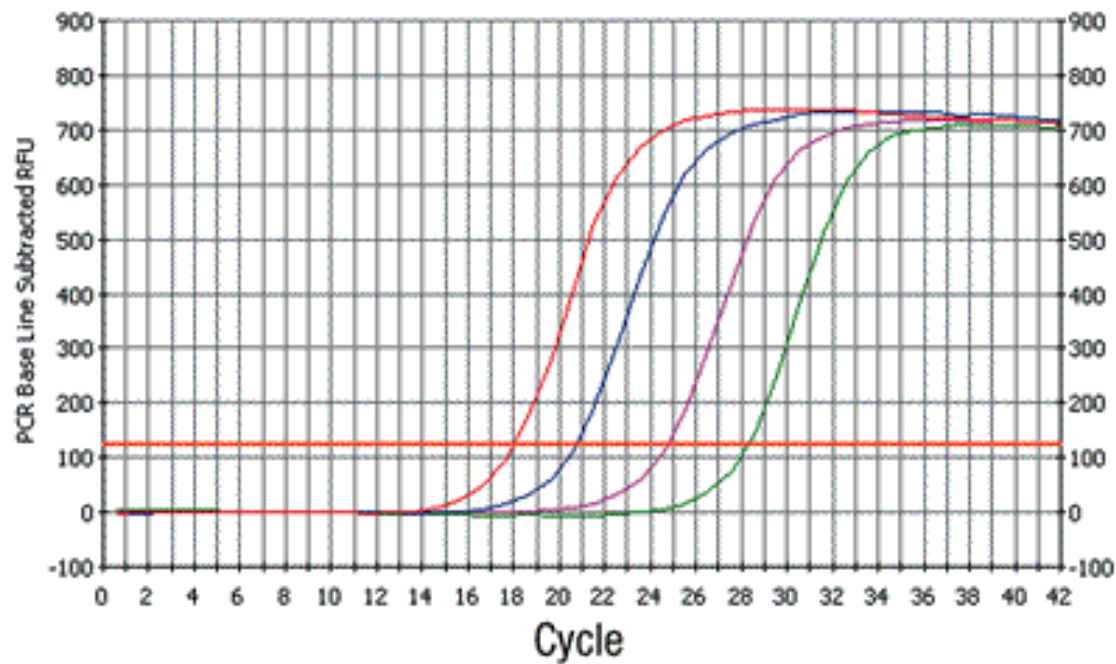
- Polymerace DNA

- Teplota dle polymerasy

- 72°C

# Real-time quantitative PCR

- Sledování amplifikace v reálném čase
- kvantifikace

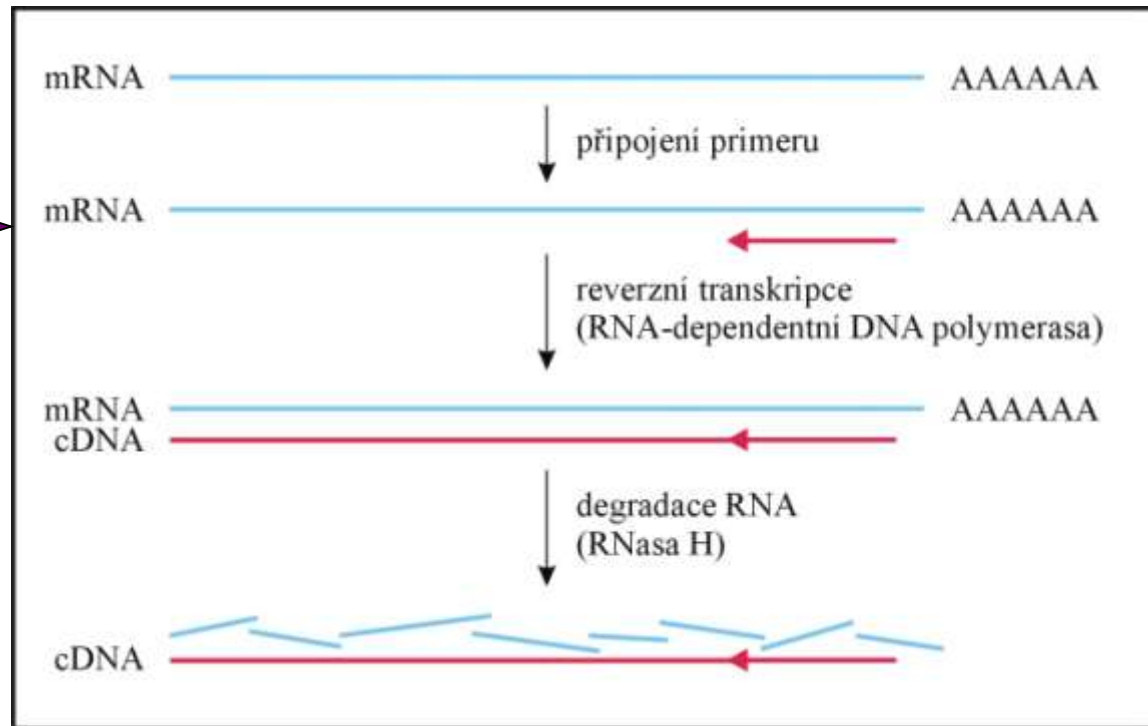
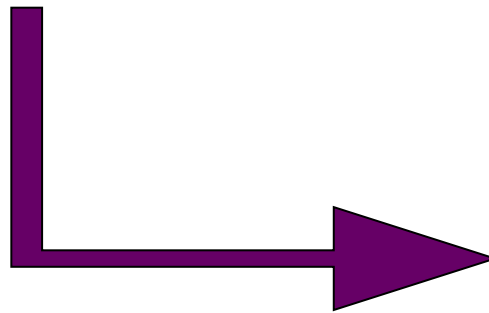


Red=10,000 cells  
Blue=1,000 cells  
Pink=100 cells  
Green=10 cells

# RT-PCR - polymerasová řetězová reakce s reversní transkripcí

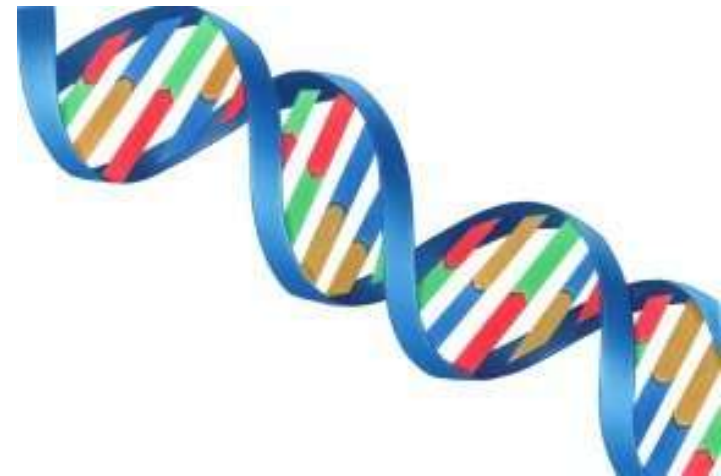


## Reversní transkripce



# Molekulárně biologické metody

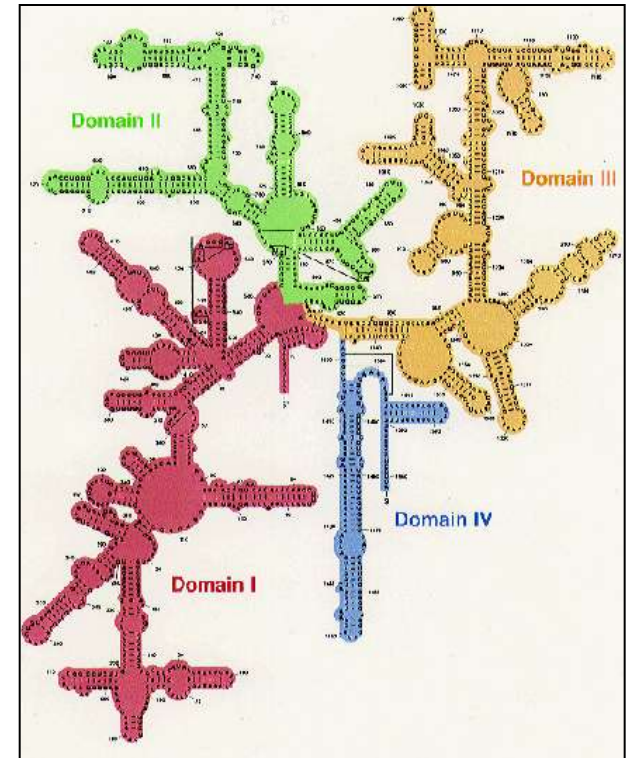
- Sekvenace nukleových kyselin
- Genové próby (FISH, RSGP,...)
- Štěpení restričními enzymy
- ARDRA
- RFLP, T-RFLP
- SSCP
- Reasociace DNA
- LMW RNA anylýza
- DGGE, TGGE, TTGE
- ...



# Přímá analýza sekvence nukleových kyselin

- Nejběžněji se pro sekvenační analýzu přírodních vzorků používá **16s rRNA**

→ sekvenování  
variabilní úseky – informace o druhu MO





# Molekulárně biologické metody

- Sekvenace nukleových kyselin
- **Genové próby (FISH, RSGP,...)**
- Štěpení restričními enzymy
- ARDRA
- RFLP, T-RFLP
- SSCP
- Reasociace DNA
- LMW RNA anylýza
- DGGE, TGGE, TTGE
- ...



# Genové próby

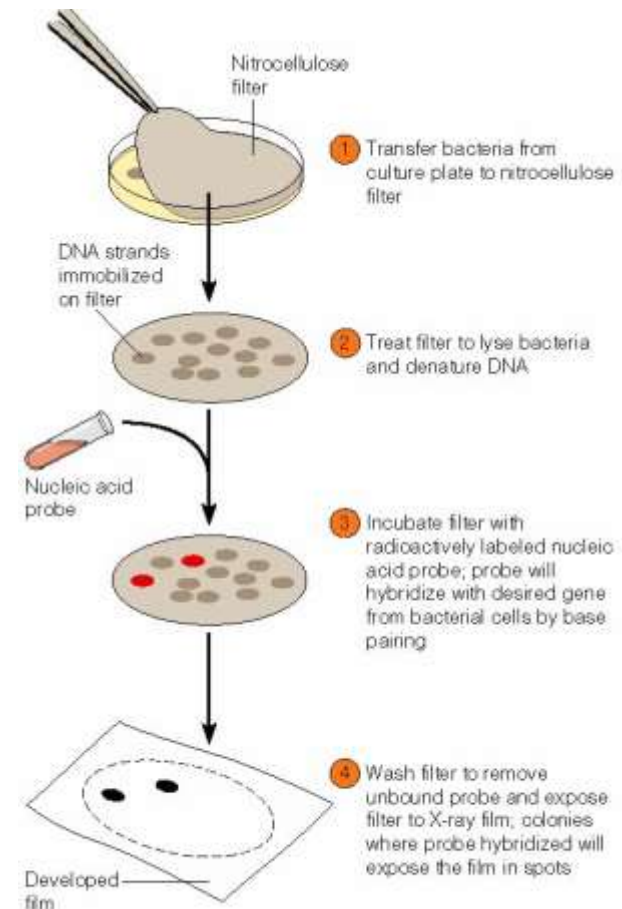


= řetězce nukleotidů (20 - 30), sekvence je komplementární k sekvenci konzervativního úseku DNA nebo RNA hledaného mikroorganismu

- Části DNA nebo RNA nesoucí nějakou značku pro jejich detekci

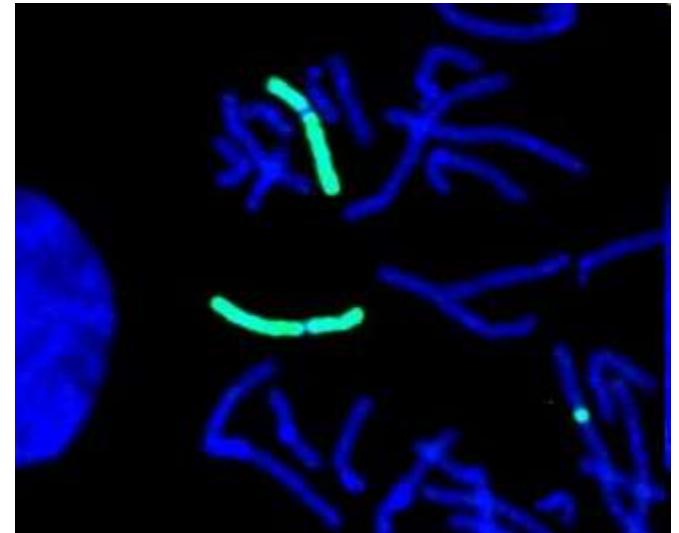
**druhově specifické próby**  
pro hledání určitých  
mikrobiálních druhů

**„funkční“ próby**  
pro hledání určitých  
vlastností dané mikrobiální  
populace



# Genové próby

- Reverse sample genome probing (RSGP)
  - Celý genom
  
- Fluorescenční in-situ hybridizace (FISH)
  - ribosomálních RNA - informace o jejich růstu, buněčné aktivitě a životaschopnosti



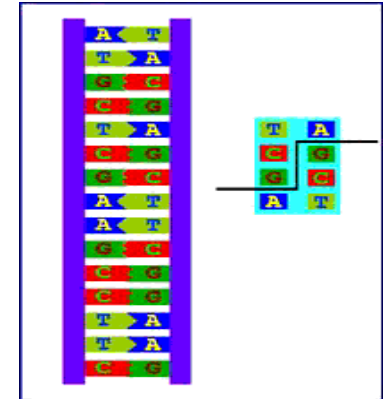
# Molekulárně biologické metody

- Sekvenace nukleových kyselin
- Genové próby (FISH, RSGP,...)
- Štěpení restričními enzymy
- ARDRA
- RFLP, T-RFLP
- SSCP
- Reasociace DNA
- LMW RNA anylýza
- DGGE, TGGE, TTGE
- ...



# Restrikční enzymy - „nůžky“

= tzv. restriktasy („DNAsy štěpící specifické sekvence“)



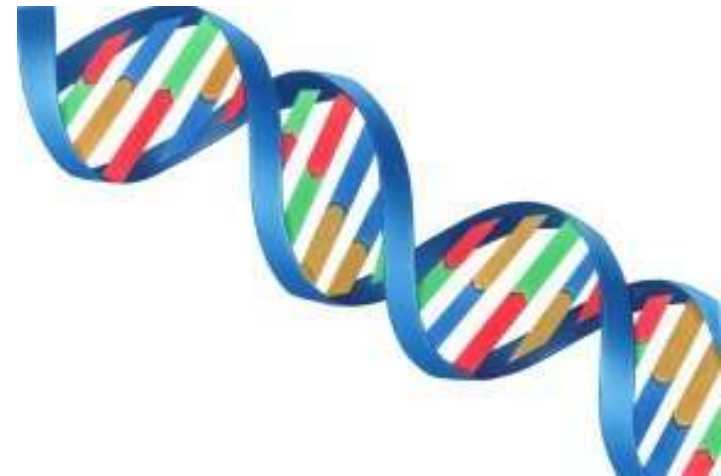
- Geny odvozené od různých populací se liší:
  - v sekvenci DNA v místech pro štěpení restriktivními enzymy
  - v délce řetězce DNA ohraničené restriktivními místy

→ specifický profil proužků odpovídající určitému druhu MO



# Molekulárně biologické metody

- Sekvenace nukleových kyselin
- Genové próby (FISH, RSGP,...)
- Štěpení restrikčními enzymy
- **ARDRA**
- **RFLP, T-RFLP**
- SSCP
- Reasociace DNA
- LMW RNA anylýza
- DGGE, TGGE, TTGE
- ...

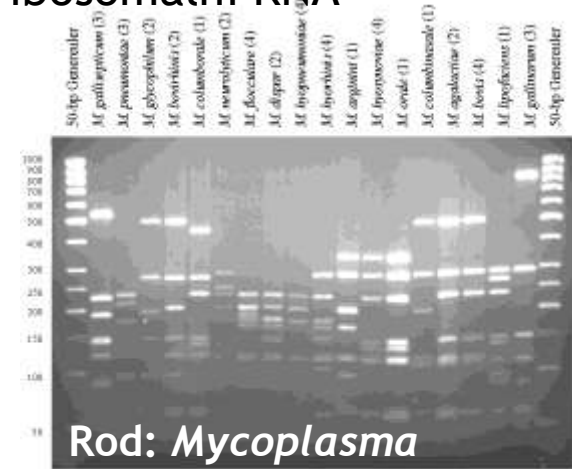


# Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis (ARDRA)

- restrikční štěpení amplifikovaného fragmentu DNA pro ribosomální RNA

## Restriction fragment length polymorphism (RFLP)

- Pro totální DNA nebo částí DNA amplifikovaných PCR
- Štěpení DNA restrikčními endonukleasami



## Terminal restriction fragment length polymorphism (T-RFLP)

PCR s primerem fluorescenčně značeným na 5' konci



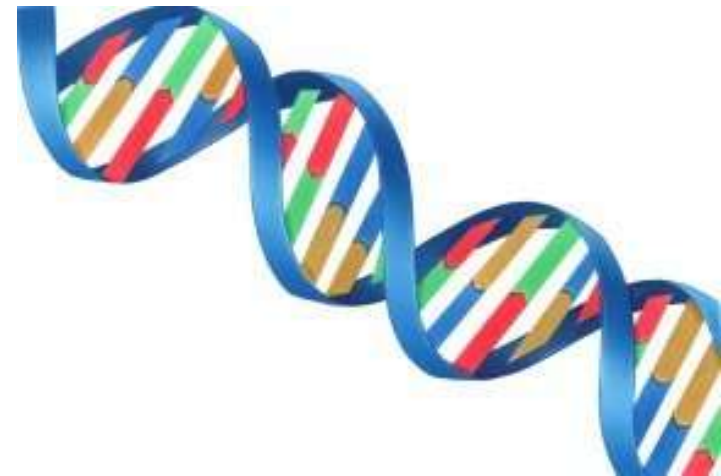
Restrikční štěpení



Rozdělení produktů

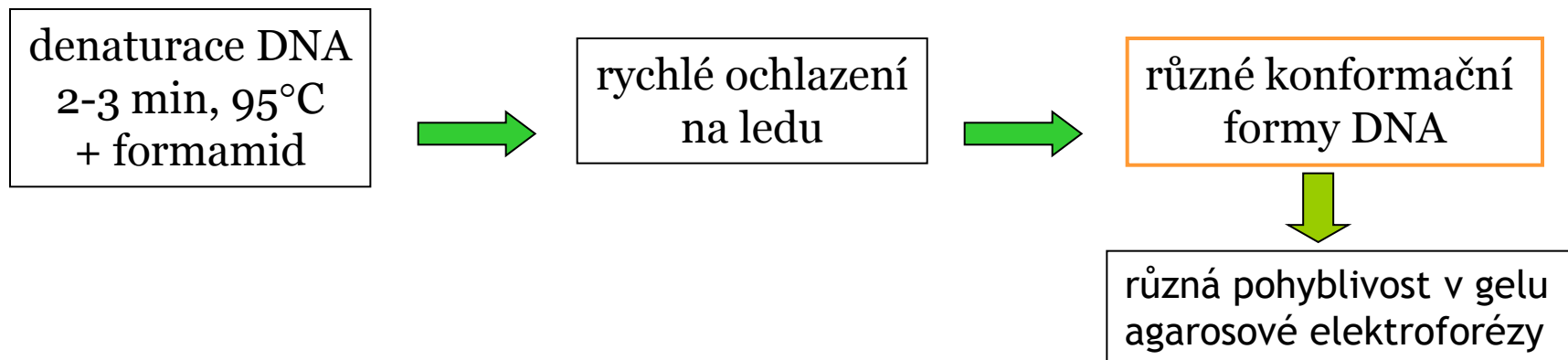
# Molekulárně biologické metody

- Sekvenace nukleových kyselin
- Genové próby (FISH, RSGP,...)
- Štěpení restrikcními enzymy
- ARDRA
- RFLP, T-RFLP
- SSCP
- Reasociace DNA
- LMW RNA anlyza
- DGGE, TGGE, TTGE
- ...





## Single strands conformation polymorfism (SSCP)



## Reasociace DNA

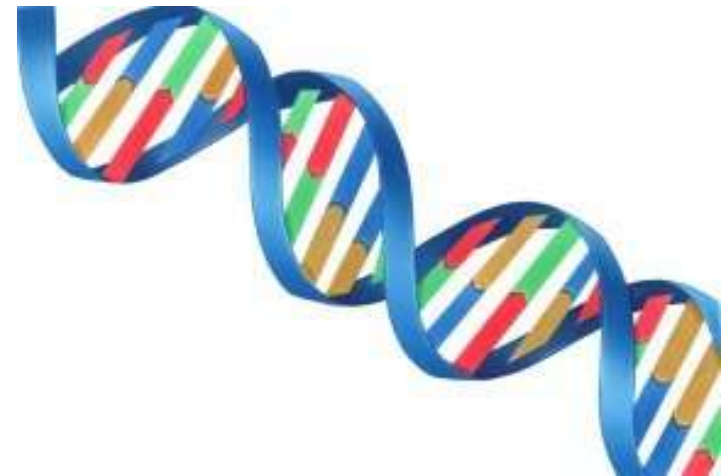
- Teplotní denaturace → renaturace → sledování míry reasociace (např.  $\Delta T_m$ )

## Low molecular weight (LMW) RNA pattern analysis

- analytická separace nízkomolekulárních RNA (5S rRNA a tRNA), charakteristické profily

# Molekulárně biologické metody

- Sekvenace nukleových kyselin
- Genové próby (FISH, RSGP,...)
- Štěpení restričními enzymy
- ARDRA
- RFLP, T-RFLP
- SSCP
- Reasociace DNA
- LMW RNA anlyza
- **DGGE, TGGE, TTGE**
- ...



# DGGE, TGGE, TTGE



Denaturační gradientová gelová elektroforéza (**DGGE**)

Teplotní gradientová gelová elektroforéza (**TGGE**)

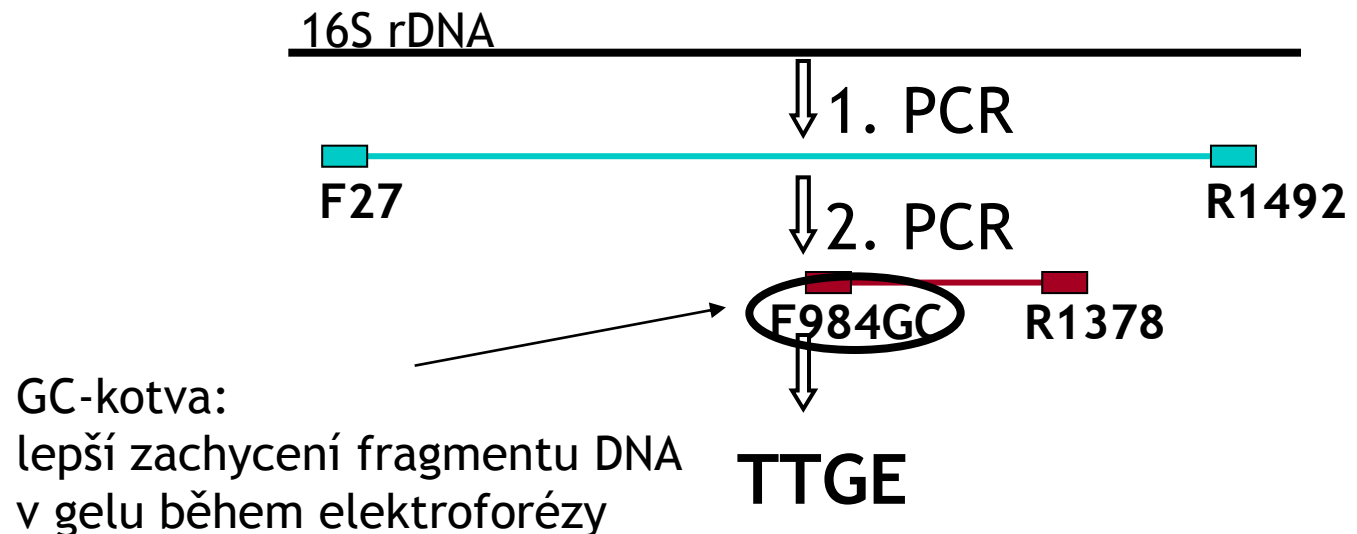
Gelová elektroforéza v režimu s měnící se teplotou (**TTGE**)

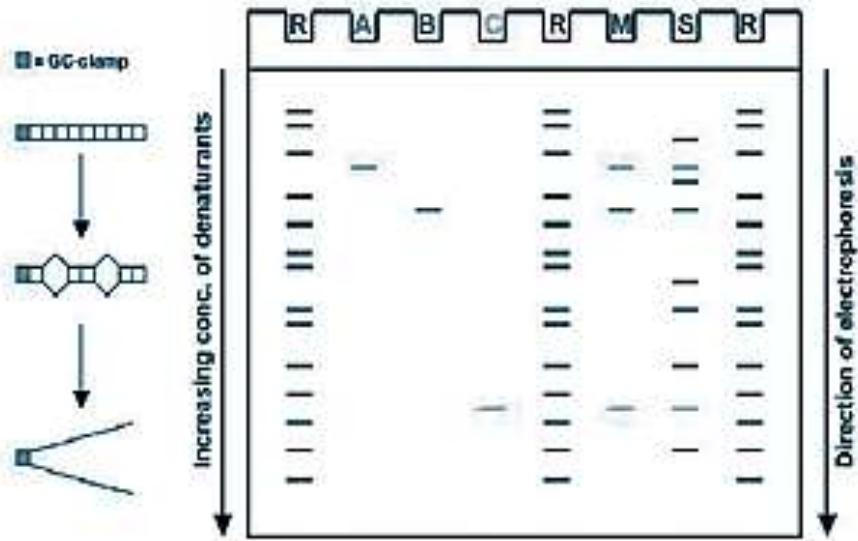
- Teplota roste během procesu v celém objemu elektroforetické jednotky

Zkoumání mikrobiální diversity

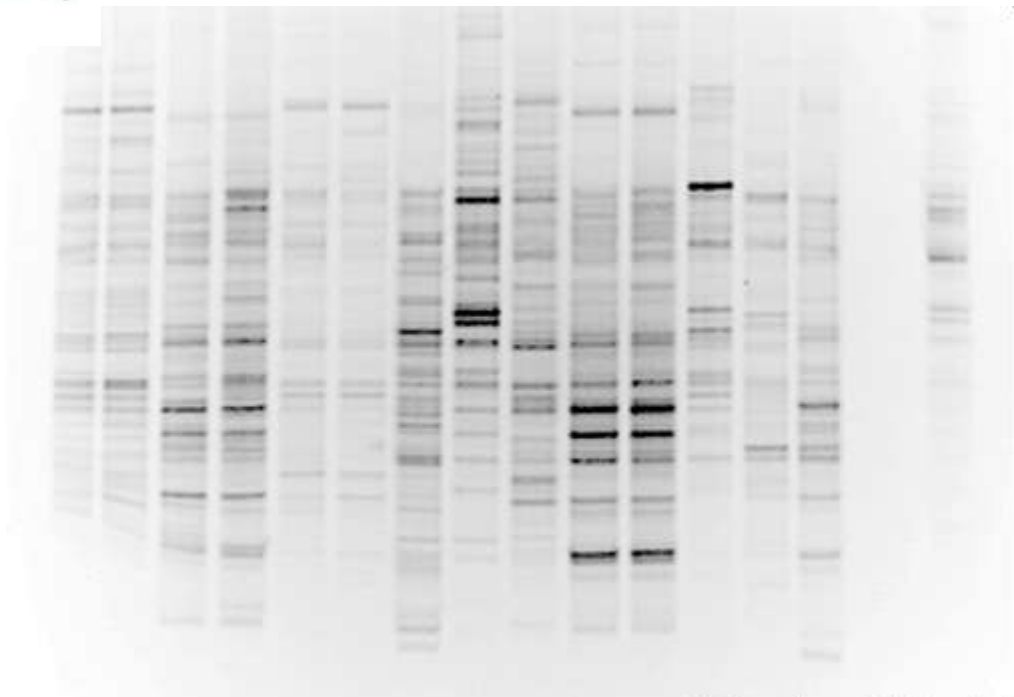
16S rDNA - primery

separace fragmentů DNA různé sekvence



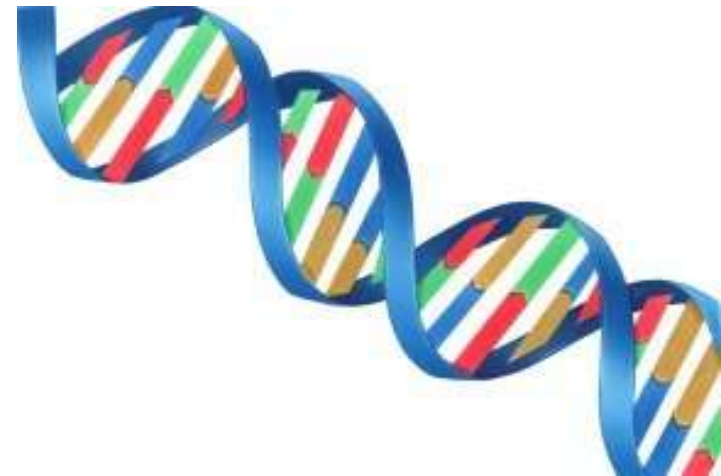


R = Reference pattern, A = Organism 1, B = Organism 2, C = Organism 3,  
 M = Mix of organisms 1, 2 and 3, S = unknown sample



# Molekulárně biologické metody

- Sekvenace nukleových kyselin
- Genové próby (FISH, RSGP,...)
- Štěpení restrikcními enzymy
- ARDRA
- RFLP, T-RFLP
- SSCP
- Reasociace DNA
- LMW RNA anylýza
- DGGE, TGGE, TTGE
- ...

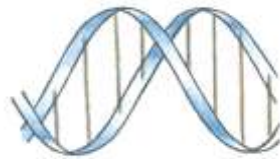


# Stable isotope probing - značení stabilními isotopy

mikrokosmos



② DNA izolace,  
isopyknická centrifugace v  
 $\text{Cs}^+$  gradientu



'lehká' DNA

'těžká' DNA



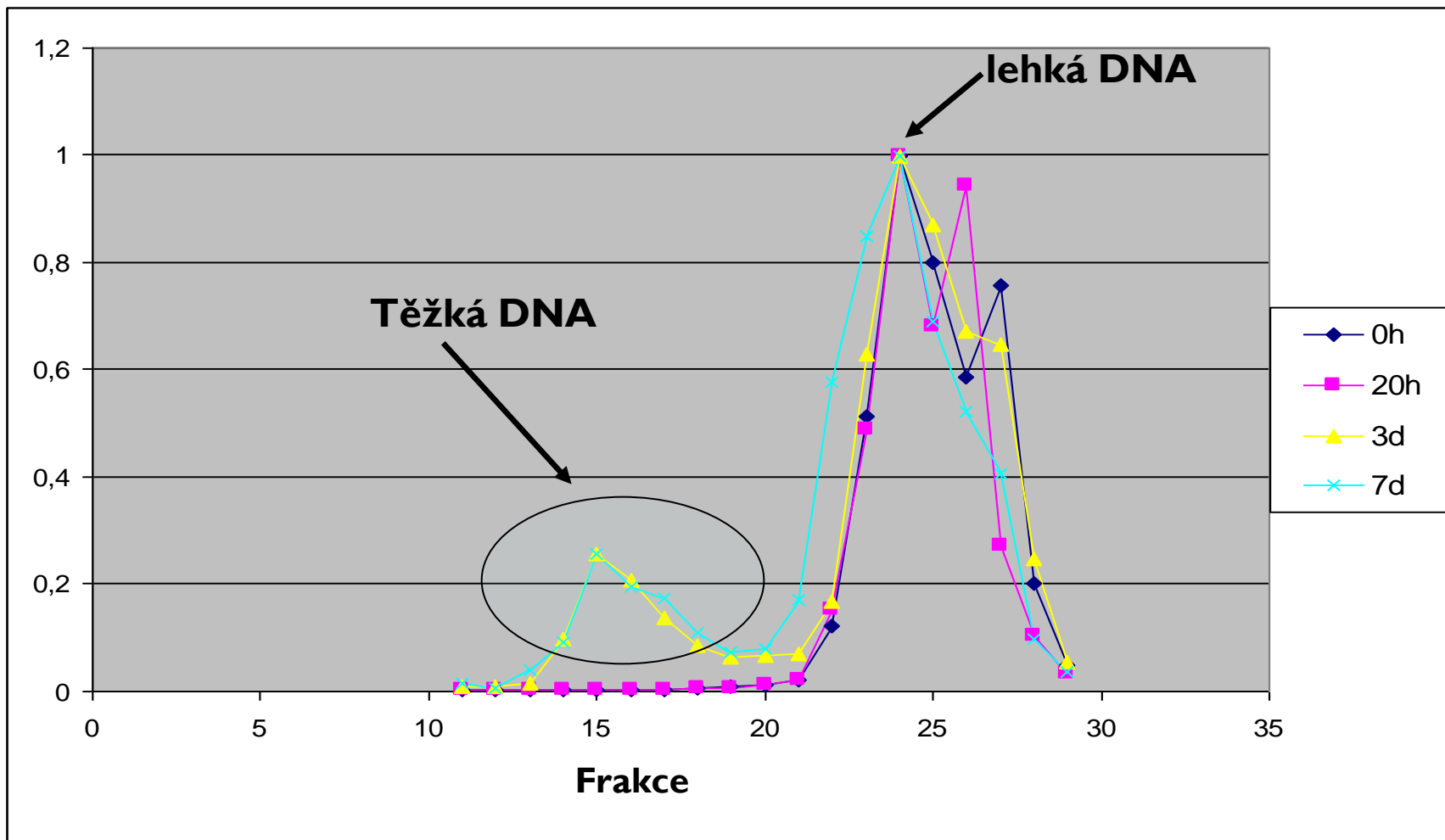
③ gradientová frakcionace,  
qPCR lokalizace frakci s  
 $^{13}\text{C}$ -DNA

① inkubace zeminy s  $^{13}\text{C}$ -  
značeným substrátem  
 $\Rightarrow$   $^{13}\text{C}$  inkorporace do  
DNA

④  $^{13}\text{C}$ -DNA analýza: metagenomická analýza,  
knihovny 16S rRNA a funkčních genů

# Real-time PCR izolovaných frakcí těžké (značené C<sup>13</sup>) a lehké DNA

Relativní koncentrace 16S rDNA



# Souhrn

- rozvoj a aplikace molekulárně biologických metod velice rychle mění pohled na mikrobiální diversitu v široké škále ekosystémů
- rychlý nástroj pro sledování změn populací
- nevylučuje se potřeba kultivačních technik !!!
- pro úplnou charakterizaci mikrobiálních populací se oba přístupy výhodně doplňují

Poděkování za přípravu podkladů Ing. K. Norkové a Ing. O. Uhlíkovi, PhD.