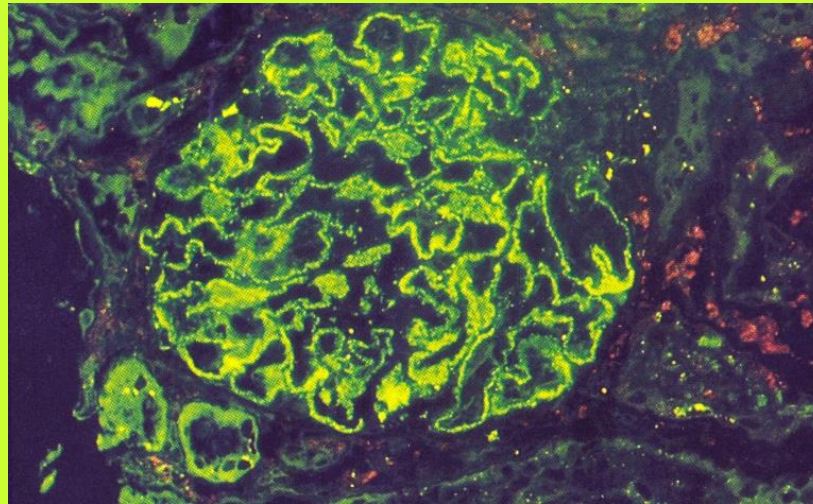


# Mikroskopické metody - fylogenetické barvení

## Izolace NK

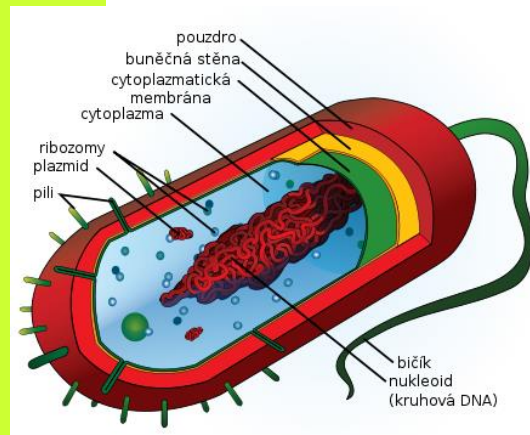
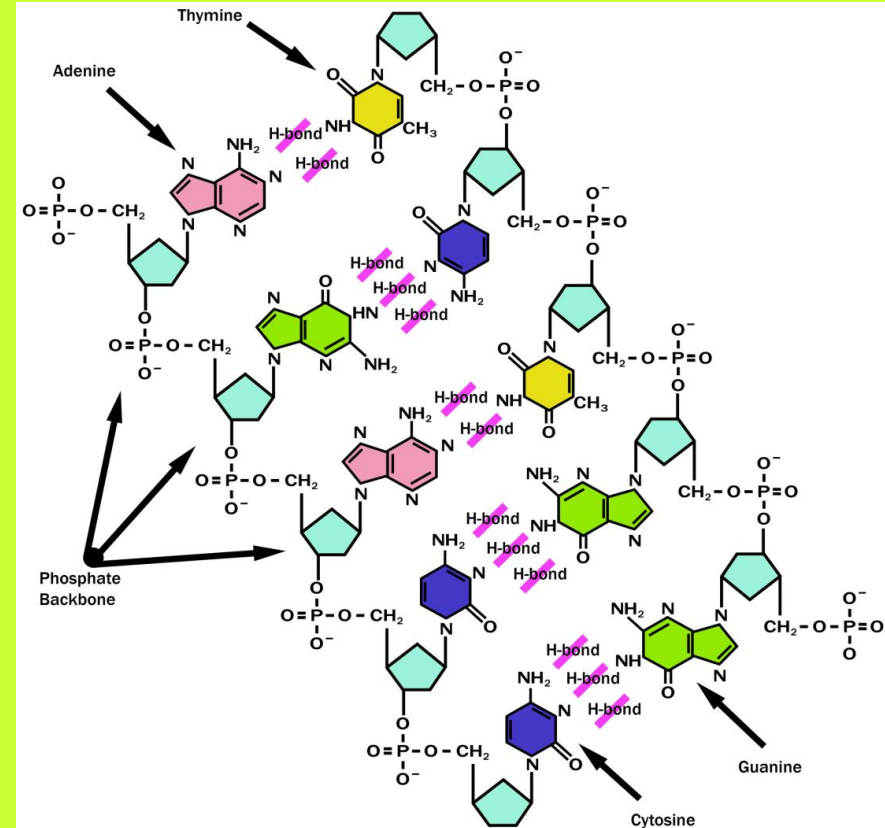
### PCR



Iva Buriánková, Katedra ekologie PŘF UP

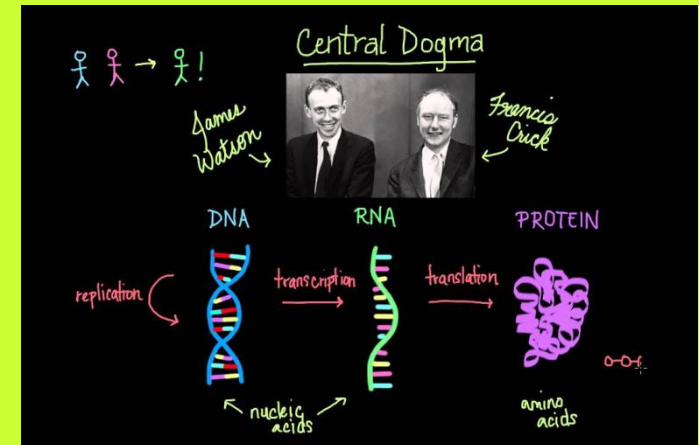
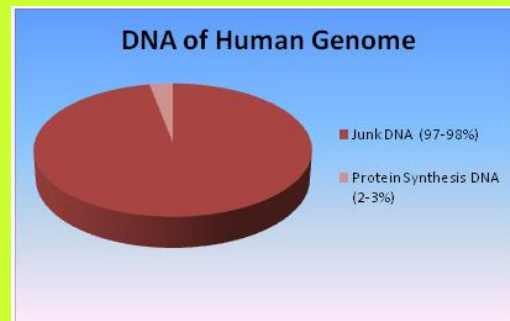
# DNA

- kyselina deoxyribonukleová
- 2 polynukleotidovými řetězci
- cukr 2-deoxy-D-ribose (oproti normální ribóze jí v poloze 2' chybí kyslík)
- dusíkaté báze - deriváty purinu (Adenin, Guanin) a pyrimidinu (Cytosin, Thymin)
- vazebné interakce - komplementarita bazí
- van der Waalsovy síly (pomáhají k celkové stabilitě molekuly)
- prokaryotická DNA obvykle uloženu volně v cytoplazmě, tzv. nukleoid
- kruhové molekuly DNA, tzv. plazmidy - horizontální výměnu genetické informace



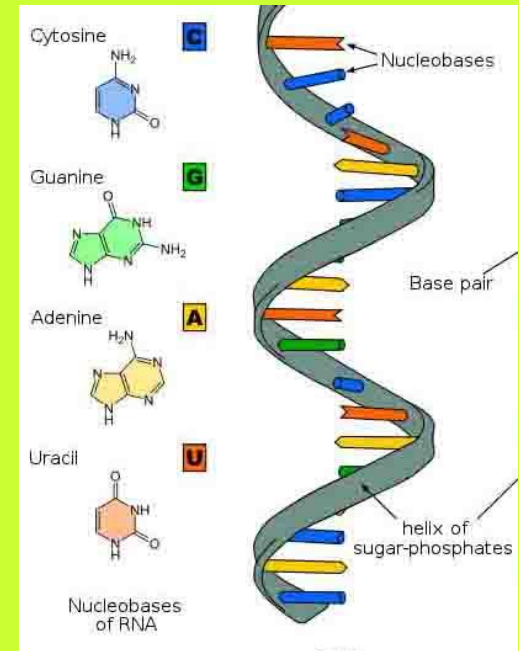
# DNA funkce

- DNA je nositelkou genetické informace všech živých organismů (i virů)
- genetický kód - trojice bází v DNA kterým u protein-kódujících genů odpovídá určitá aminokyselina. Aminokyseliny jsou základní stavební kameny bílkovin
- genetická informace - návod na výrobu bílkovin
- Transkripce - DNA je nejprve přepisována v RNA (obvykle tzv. mRNA)
- Translace - RNA použita jako vzor pro řazení aminokyselin - tvorba bílkovin
- nekódující DNA - velká část genomu mnoha organismů však není součástí žádného genu a ani se nepřepisuje v RNA, někdy však pomáhá regulovat spouštění a vypínání okolních genů
- junk (odpadní) DNA - velká část nekódující DNA
- dle současné úrovně znalostí nemá žádnou konkr. funkci
- zřejmě kóduje různé krátké regulační RNA
- cca 10-20 % genomu má díky těmto RNA významnou regulační funkci



# RNA

- řetězec, v jehož kostře se střídá cukr ribóza, která má na druhém uhlíku hydroxyl s fosfátovou skupinou
- cukr se pak rovněž vážou jednotlivé nukleové báze, adenin (A), guanin (G), cytosin (C), a uracil (U)
- občas nachází i minoritní báze, jako je například dihydrouridin (D), pseudouridin ( $\psi$ ), inosin (I), hypoxantin či 5-methylcytosin (m5C)
- obvykle kratší jednoduchá jednovláknová existuje i dvouvláknová RNA (viry)
- reaktivnější, v zásaditém prostředí je nestálá a je citlivější k různým enzymům
- díky své reaktivitě může plnit RNA v mnohých případech roli katalyzátoru (tzv. ribozym) - funguje jako enzym



Ribozymy nejčastěji katalyzují štěpení cukr-fosfátové páteře RNA a to buď vlastního vlákna nebo RNA vlákna jiné RNA. Známým příkladem ribozymu je např. také 23S-rRNA velké podjednotky ribozomů která katalyzuje syntézu peptidové vazby



# RNA funkce

Mediátorová RNA (mRNA z angl. messenger RNA) je přepisována přímo z genové sekvence DNA

Nekódující RNA - RNA, která nenese informaci o struktuře budoucího proteinu, má místo toho jiné funkce:

tRNA (transferová RNA) - zajišťuje transport aminokyselin k ribozomu

rRNA (ribosomální RNA) - stavební funkce v ribozomu

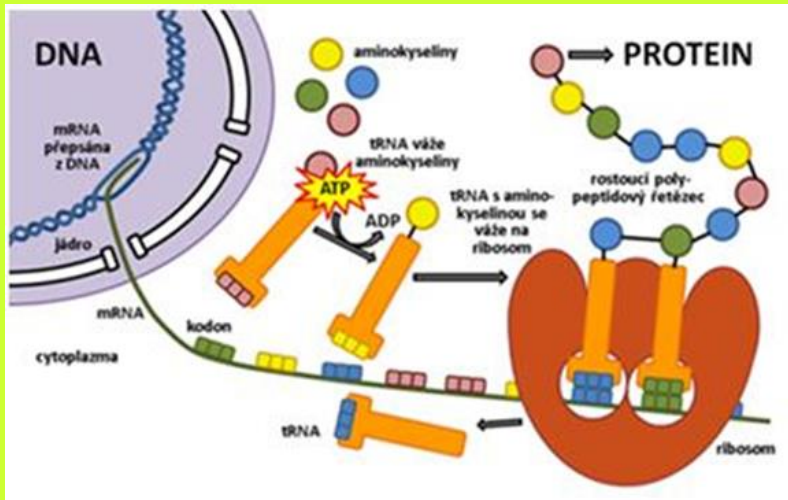
miRNA (microRNA) - regulace genové exprese některých genů

RNA je syntetizovaná enzymy RNA polymerázami podle matrice DNA

RNA polymerázy rozpoznávají specifické úseky DNA, které označují počátek transkripce (přepis DNA na RNA) - promotory

u prokaryot jsou veškeré RNA syntetizovány jedinou RNA-polymerasou

u eukaryot tři základní typy: RNA-polymerasa I, II a III, z nichž každá syntetizuje jiné RNA



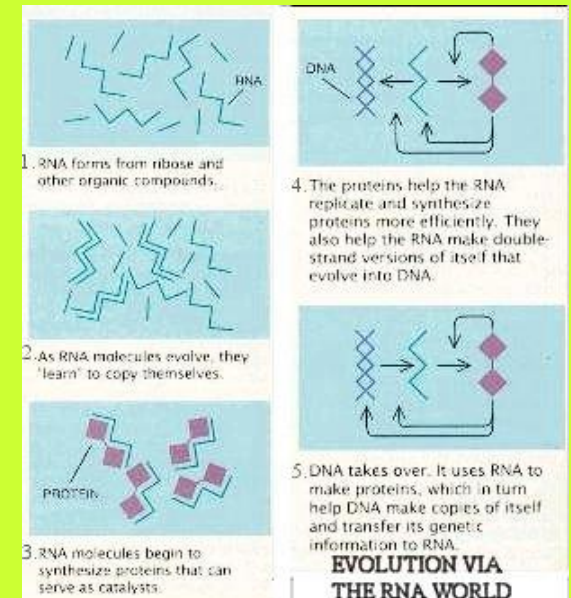
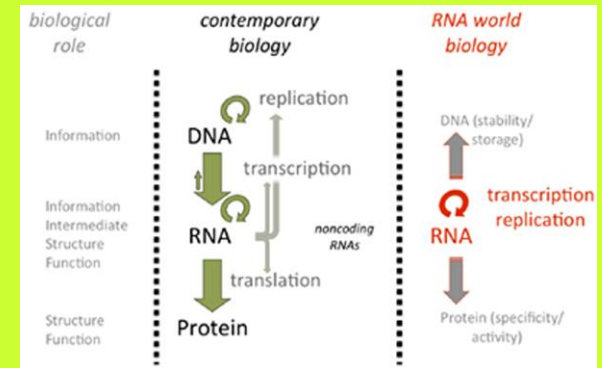
# RNA svět

1989- Nobelova cena za objevení ribozymů T. R. Cech a S. Altman  
- padla teorie, že biologickými katalyzátory jsou pouze proteinové enzymy

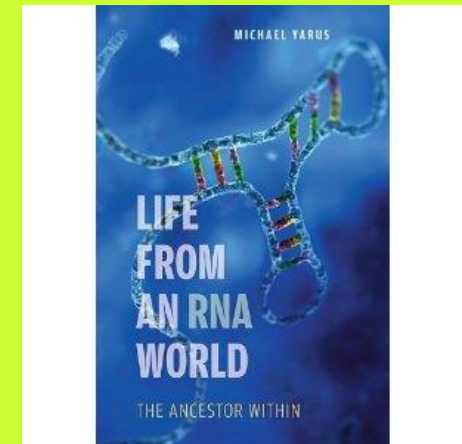
**Walter Gilbert 1986**

**RNA svět - hypotéza která předpokládá, že v určité etapě vývoje života na Zemi molekuly RNA sloužily jako hlavní biologické katalyzátory a zároveň byly schopné přenášet genetickou informaci**

- Reaguje na problematický způsob vzniku živých organismů vzhledem k jejich genetickému kódu
- Replikaci organismů zajišťuje molekula DNA - předává informaci proteinům (enzymům), ale bez jejich existence a katalýzy sama nemůže vznikat, replikovat se
- DNA a proteiny proto mohou při přenosu informace fungovat pouze společně, není možné říci, co se vyvinulo dřív
- Přímý vznik živé buňky s takto složitým systémem replikace je ve smyslu moderní vědecké abiogeneze nemyslitelný
- Řešení problému se proto hledalo s předpokladem, že dnešnímu životu předcházely organismy s jednodušším replikačním systémem
- Systém přenosu informací v prvních živých organismech by tak mohl být založen pouze na RNA, která by v sobě spojovala vlastnosti nukleové kyseliny i proteinů
- Tento způsob navrhli nezávisle na sobě v 60. letech Carl Woese, Francis Crick aj



# Achillova pata RNA světa

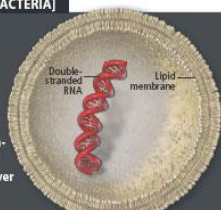


- chybí jakékoliv nálezy prvotních organismů v geologickém záznamu
- mnohé úspěšné laboratorní experimenty odhalily zatím jen zlomky možných reakcí
- nejsou známe ani žádné organismy, které by mohly v RNA světě fungovat - metabolismus zcela odlišný
- nejasnosti o vzniku molekul RNA v prebiotickém světě - syntéza v tehdejší prostředí velmi komplikovaná
- velmi malá stabilita molekul ribonukleové kyseliny - existence nechráněných molekul téměř vyloučená - rychlý rozklad vlivem silného ultrafialového záření

[FROM RNA WORLD TO BACTERIA]

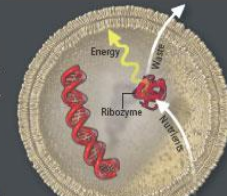
## Journey to the Modern Cell

After life got started, competition among life-forms fueled the drive toward ever more complex organisms. We may never know the exact details of early evolution, but here is a plausible sequence of some of the major events that led from the first protocell to DNA-based cells such as bacteria.

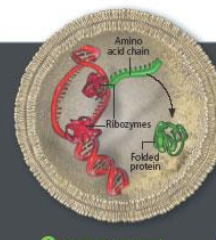


**1 EVOLUTION STARTS** ▲  
The first protocell is just a sac of water and RNA and requires an external stimulus (such as cycles of heat and cold) to reproduce. But it will soon acquire new traits.

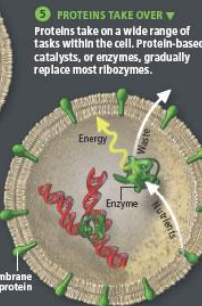
**2 RNA CATALYSTS** ▼  
Ribozymes—folded RNA molecules analogous to protein-based enzymes—arise and take on such jobs as speeding up reproduction and strengthening the protocell's membrane. Consequently, protocells begin to reproduce on their own.



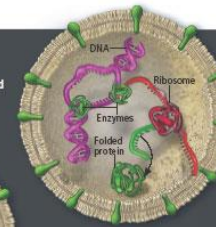
**3 METABOLISM BEGINS** ▲  
Other ribozymes catalyze metabolism—chains of chemical reactions that enable protocells to tap into nutrients from the environment.



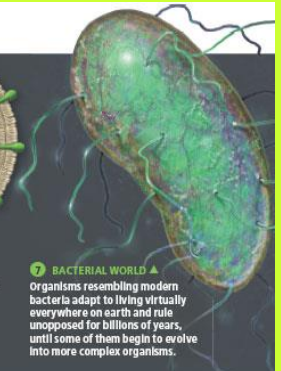
**4 PROTEINS APPEAR** ▲  
Complex systems of RNA catalysts begin to translate strings of RNA letters (genes) into chains of amino acids (proteins). Proteins later prove to be more efficient catalysts and able to carry out a variety of tasks.



**5 PROTEINS TAKE OVER** ▼  
Proteins take on a wide range of tasks within the cell. Protein-based catalysts, or enzymes, gradually replace most ribozymes.



**6 THE BIRTH OF DNA** ▲  
Other enzymes begin to make DNA. Thanks to its superior stability, DNA takes on the role of primary genetic molecule. RNA's main role is now to act as a bridge between DNA and proteins.



**7 BACTERIAL WORLD** ▲  
Organisms resembling modern bacteria adapt to living virtually everywhere on earth and rule unopposed for billions of years, until some of them begin to evolve into more complex organisms.

# DNA nebo RNA?

**DNA** - fylogenetické nebo „funkční“ informace o aktivní i neaktivní mikroflóře

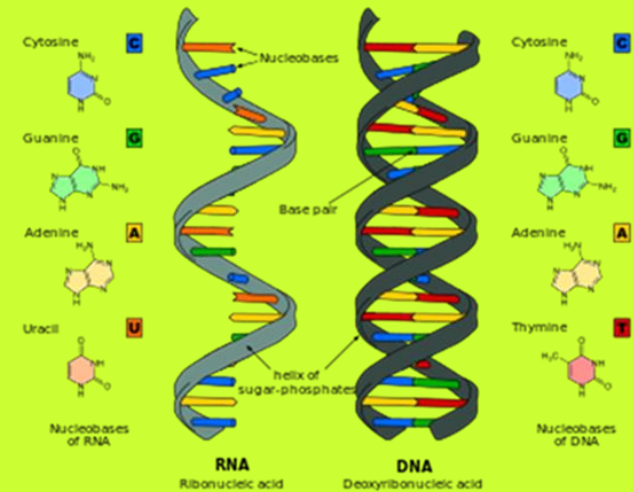
## Celková DNA v prostředí:

- Intracelulární DNA (žijící mikroorganismy)
- Extracelulární DNA (extracelulární matrix)
- mrtvé buňky
- plasmidy
- viry
- volná DNA
- DNA navázaná v organominerálních komplexech



přirozená transformace -  
horizontální přenos genů

zdroj živin( P, N) a energie



**rRNA** - sledování neaktivnější populace

**DNA 10 - 20% v bunce**  
**RNA 3 - 4%**

## Celková RNA v prostředí:

- Intracelulární RNA (žijící mikroorganismy): rRNA, mRNA, tRNA, ncRNA, ... Rychlá degradace - Very quick turnover of RNA molecules



evropský  
sociální  
fond v ČR



EVROPSKÁ UNIE



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,  
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



OP Vzdělávání  
pro konkurenceschopnost

INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ



# Identifikace mikroorganismů

## Taxonomická kritéria

- fenotypická
- tvar, velikost, pohyblivost
- GRAMovo barvení
- tvorba spor
- přítomnost a množství bičíků
- přítomnost kapsule, tvar a barva kolonií, pigmentové formace
- typ metabolismu
- vztah ke kyslíku
- povrchové antigeny
- ekologie, typický habitat

## Genotypická kritéria

- genetické markery, 16S rRNA
- G-C poměr párů
- rekombinace genetického materiálu



Problémy identifikace bakterií z vody  
Nejasná definice druhů  
variability mezi strains stejného taxonu  
taxonomie vs. ekologická role v prostředí  
omezená možná kultivace bakterií  
nejvíce aktivní buňky tvoří jen malou část  
společenstva

Potřeba najít specifické markery  
– např. 16S rRNA



evropský  
sociální  
fond v ČR



EVROPSKÁ UNIE



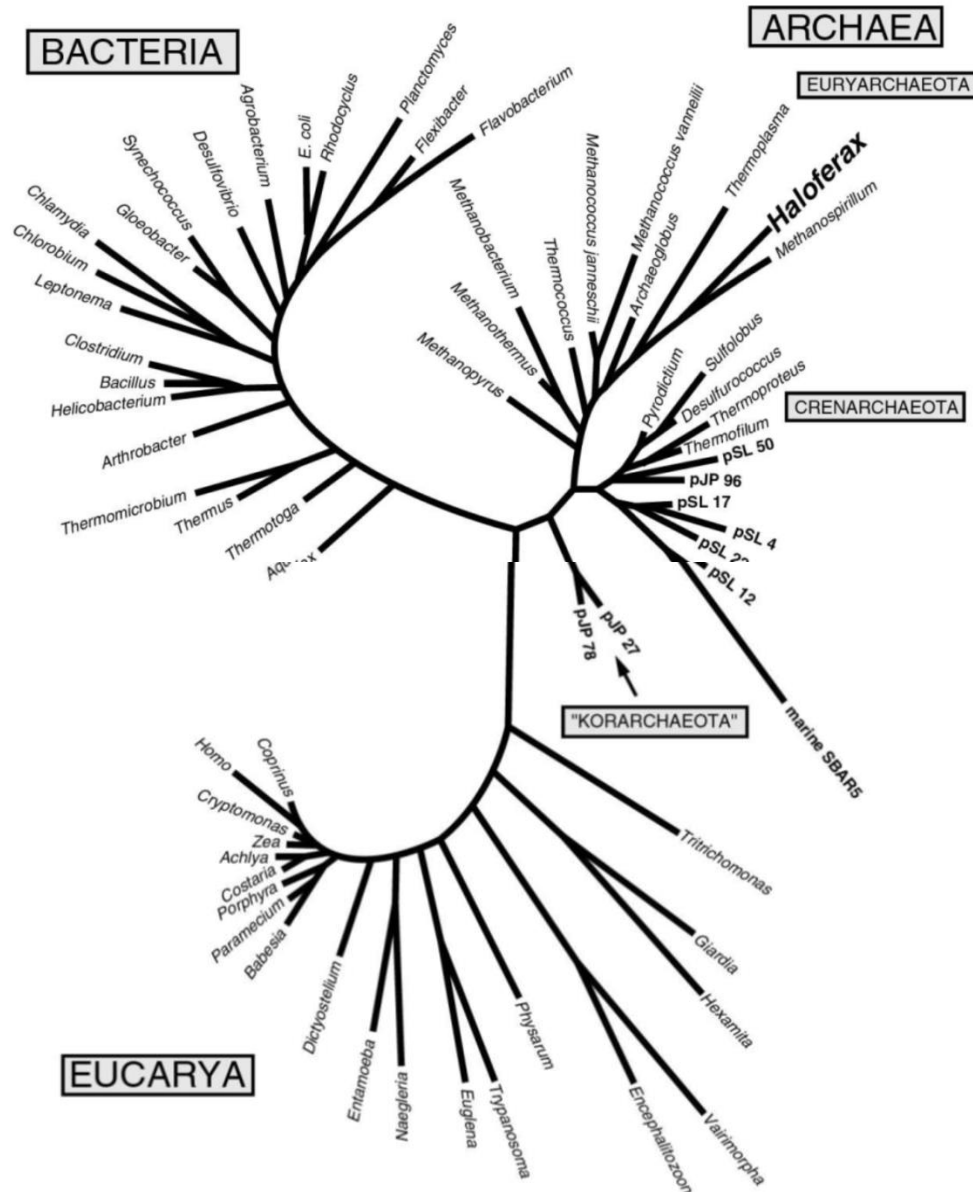
MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,  
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



OP Vzdělávání  
pro konkurenceschopnost

INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

# "Universal" Unrooted Phylogenetic Tree



Analýza fylogenetických znaků umožňuje identifikaci fylogenetické pozice organismu

# Molekulárně biologické metody identifikace a detekce mikroorganismů

- Sledování konzervativních úseků nukleových kyselin
- Zaměření na **primární strukturu** nukleových kyselin, která je typická pro určitý druh mikroorganismu

Sleduje se:

- **mikrobiální diversita** („různorodost“) v různých částech životního prostředí
- **funkční aktivity** mikroorganismů, jejich množství a jiné vlastnosti



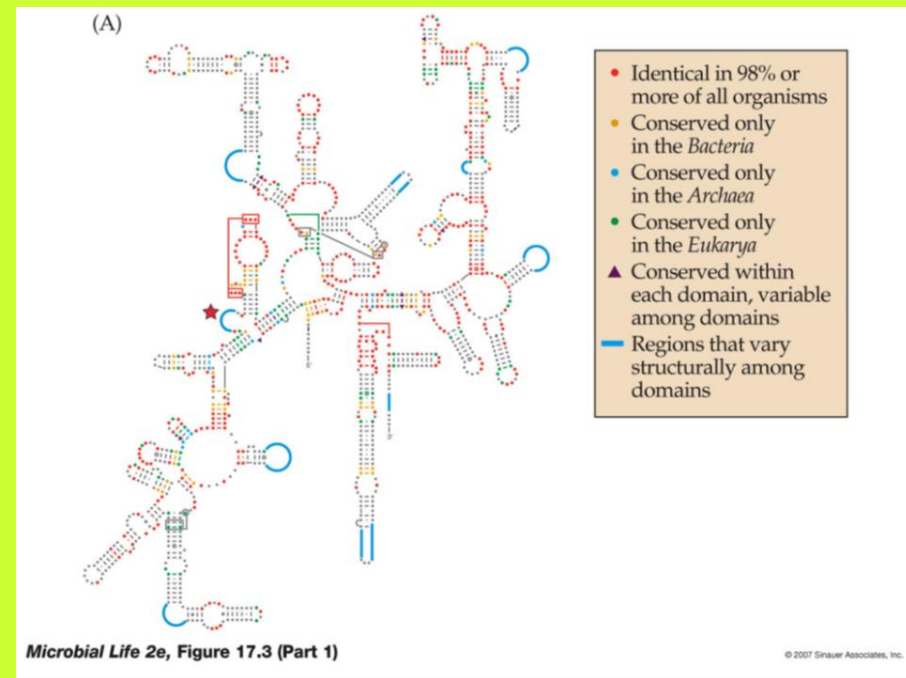
# 16S rRNA

## Struktura malé ribozomální podjednotky 16S rRNA prokaryot

- lineární sekvence obsahující 4 odlišné (G, C, A, U)
- délka kolem 1500 nukleotidů

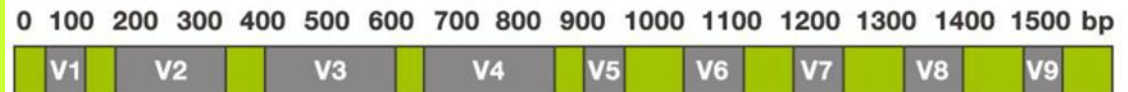
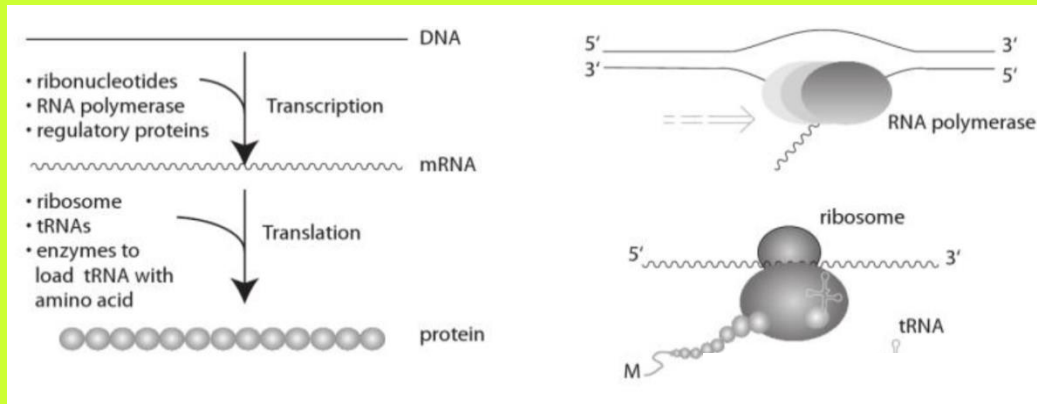
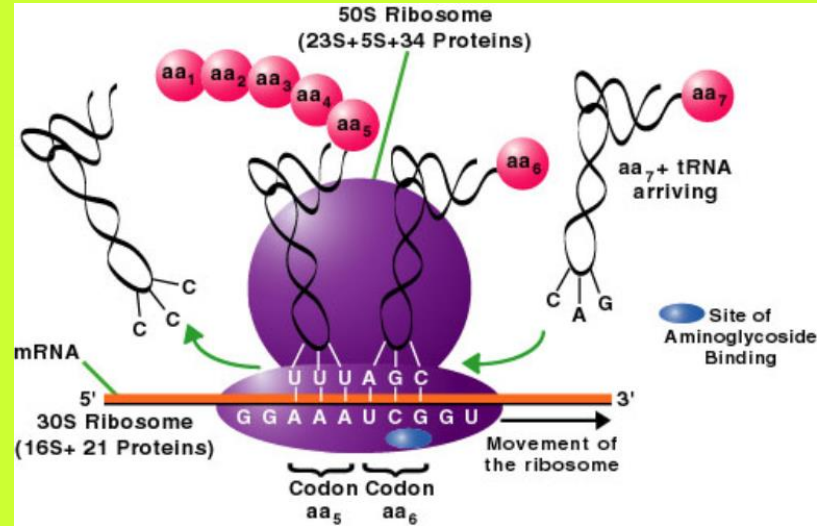
## 16S rRNA = ukazatel mikrobiální diversity

- část malé ribozomální podjednotky
- Molekulární „chronometr“
- univerzální molekula!
- funkčně homologní
- obsahuje vysoce konzervativní úseky
- variabilní sekvence - reflektují
- evoluční změny





# Funkce ribozomu

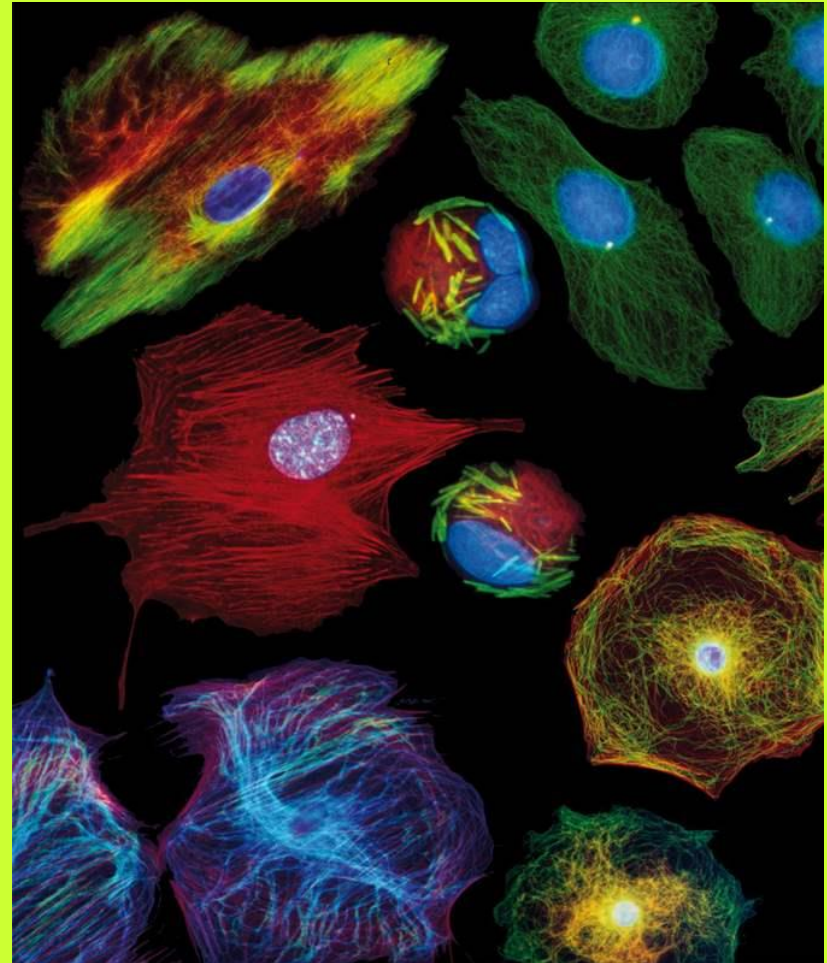


**CONSERVED REGIONS:** unspecific applications

**VARIABLE REGIONS:** group or species-specific applications

# Fluorescenční mikroskopie

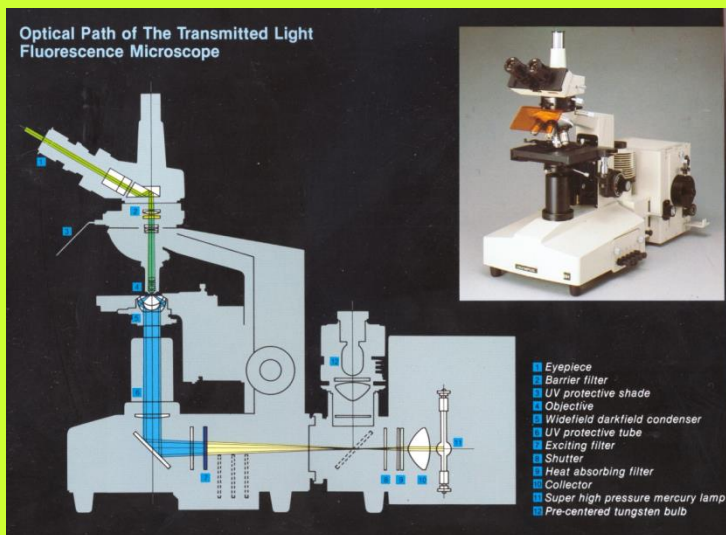
- Využívá světla kratších vlnových délek – UV oblast + viditelné záření kratších délek
- Fluorescence schopnost látky absorbovat UV paprsky nebo krátkovlnné světlo a emitovat viditelné světlo delší vlnové délky
- autofluorescence (primární fluorescence) chlorofyl, vitaminy
- sekundární fluorescence - barvení fluorescenčními barvivy (DAPI, fluorescein, akridinová oranž, calcofluor)
- vazba fluorescenčních barviv na protilátku nebo na genovou sondu
- možnost vysoce specifických barvení určitých buněčných částí



# Fluorescenční mikroskopie

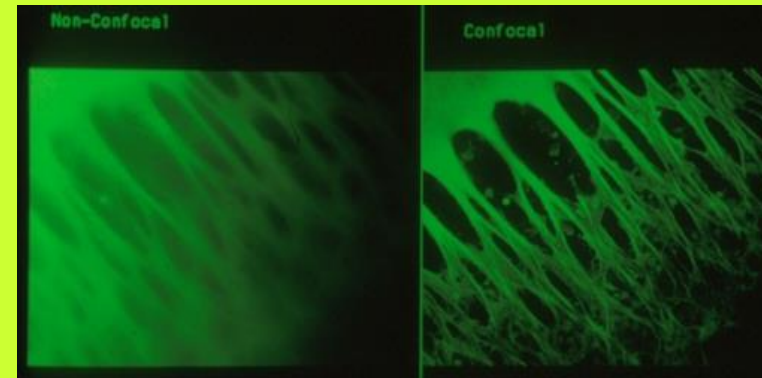
## Fluorescenční mikroskop

- zdroj světla se u fluorescenčního mikroskopu používá **rtuťová výbojka**
- excitační světlo prochází objektivem na preparát a emisní světlo se vrací zpět do objektivu
- Systém několika filtrů -excitační filtr, dichroické zrcadlo a emisní filtr, zajišťují, aby se ze světelného zdroje vybralo požadované rozmezí vlnových délek, dopadlo na vzorek a vyvolané fluorescenční světlo dopadlo na dichroické zrcadlo - odráží excitační světlo do objektivu a propouští emisní světlo do okuláru podle toho, jakou má vlnovou délku
- tzv. kostka - dvě stěny jsou tvořeny filtry excitačním a emisním filtrem a úhlopříčka dichroickým zrcadlem
- Kostky specifické pro daný fluorochrom



## Konfokální mikroskop

- zdrojem světla vyvolávající fluorescenci je **laser osvětlující vždy jen 1 bod**
- posouvání paprsku po objektu →obraz skládán z jednotlivých bodů
- posun paprsku do jiné hloubky → optické řezy → složení do 3D obrazu
- vysoká citlivost, ostrý obraz
- malé množství barviv, pozorování živých buněk





# Fluorescenční in situ hybridizace FISH

- v molekulární biologii znamená pojem **hybridizace** proces spojení dvou komplementárních řetězců DNA podle pravidel o párování bází (napojit specifickou sondu se zkoumaným vláknem DNA)
- **technologie využívající fluorescenční barviva**
- Schopnost jednořetězcové DNA sondy značené fluorochromem vázat komplementární úsek cílové DNA fixované na mikroskopickém preparátu s následnou vizualizací a analýzou fluorescenčních signálů ve fluorescenčním mikroskopu.
  - fluorescenčním barvivem (např. zelený fluorescein, texaská červeň, ...) se označí sonda = malý fragment DNA (barviva Texas red, FITC atd.)
  - DNA sonda se naváže k chromosomální DNA (na základě komplementárního párování)
  - za zvýšené teploty (kolem 75°C) dochází k denaturaci vlákna sondy i vyšetřované DNA
  - DNA se rozvolní a po následném ochlazení se sonda hybridizuje na vyšetřovaný úsek chromozomu
- FISH umožňuje označit konkrétní místo na DNA, s rozlišením 500 000-10 000 000 nukleotidů
- 80. léta medicína - cytogenetika, později biologie
- telomery, centromery, různé inserce



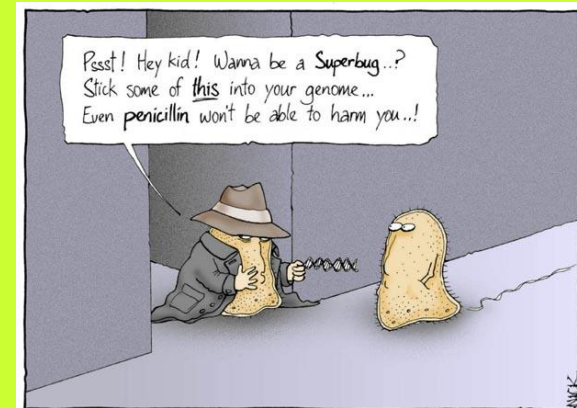
Červci jsou mezi hemipterním hmyzem unikátní symbiotickým systémem, bez něhož nejsou schopni přežít. Ve specializovaném orgánu zvaném bakteriom žijí uvnitř buněk červce symbiotické bakterie rodu *Tremblaya*. Jedna podskupina červců hostí uvnitř těchto symbiontů navíc ještě další, intrabakter. symbionty.



# FISH v environmentální mikrobiologii

## Metoda k identifikaci bakterií / archeí

- **Není ontogeneze, opakování ve fylogenezi**
- **žádné fosilie**
- **orgány, tkáně**
- **nízká morfogická diverzita**
- **malé množství individuálních determinačních znaků**
- **obtížná určení - který znak je evolučně starší?**
- **obtížná definice biol. druhů**
- **genetická promiskuita - častý horizontální přenos genetické informace pomocí plazmidů**
- **skupiny bakterie zpravidla netvoří uzavřené skupiny individuí, spíše kontinuální přechody**



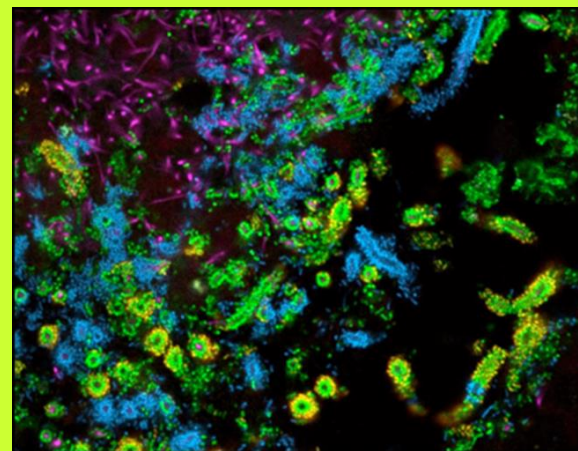
It was on a short-cut through the hospital kitchens that Albert was first approached by a member of the Antibiotic Resistance.

# Fluorescence In Situ Hybridization (FISH)

- Umožňuje identifikaci bakterií ve smíšeném společenstvu bez kultivace
- Využívá oligonukleotidové sondy cílené na rRNA
- Teorie - každý ribozom v bakteriální buňce obsahuje 1 kopii 5S, 16S a 23S rRNA
- Je obarven 1 molekulou sondy během hybridizace
- Vyšší množství ribozomů v buňce poskytuje přirozené zesílení signálu

## Ribosomálních RNA

- informace o jejich růstu, buněčné aktivitě a Životaschopnosti
- Epifluorescenční, konfokální mikroskopie, flow cytometrie...
- umožňuje detekovat specifické genové sekvence v biofilmech, sedimentech, kalech a vzorcích vod.
- Př. Biofilmy - multidruhové
  - vizualizace distribuce specifického druhu v biofilmu
  - distribuce více druhů in situ - určení struktury biofilmu



Complex "corn cobs" in dental plaque. The plaque was then embedded in acrylic resin and sectioned to 2 microns thickness. FISH was performed on the plaque using probes for *Corynebacterium* (magenta), *Streptococcus* (green), *Aggregatibacter* (orange), and *Porphyromonas* (blue). Each tiny dot is an individual bacterial cell. The *Streptococcus* cells form "corn cobs" surrounding *Corynebacterium* filaments, and *Aggregatibacter* cells surround some of the *Streptococcus* corn cobs. *Porphyromonas* cells also form corn cobs around *Corynebacterium* filaments.

# Oligonukleotidové sondy - próby

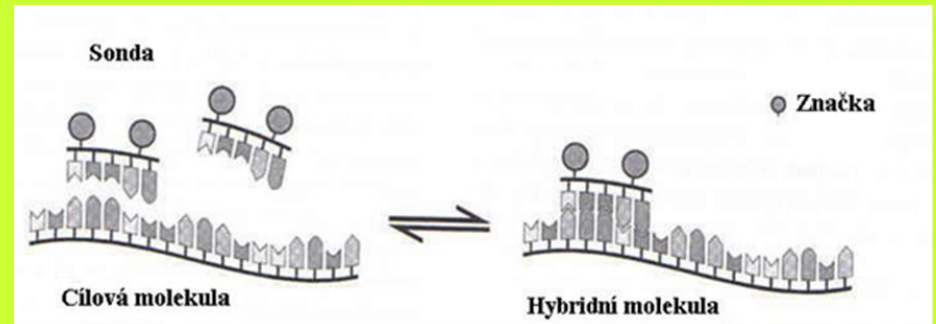
- **Sonda** - jako sondu označujeme v molekulární genetice značený úsek nukleové kyseliny (radioaktivně či chemiluminiscencí), kterou použijeme k vyhledání určité sekvence ve vzorku testované DNA nebo RNA na základě komplementarity bází  
= Genové próby - řetězce nukleotidů (20 - 30 bází), sekvence je komplementární k sekvenci konzervativního úseku DNA nebo RNA hledaného mikroorganismu
- **Značení sond** na 5' konci sondy přes linker
  - radioaktivní, neradioaktivní
  - přímo - fluorochromy : fluorescein, tetramethylrhodamin, texaská červeň, indokarbocyaninová barviva Cy3, Cy5 a Cy7
  - nepřímo - např. biotin či digoxigenin, antigenní látka

## druhově specifické próby

- pro hledání určitých mikrobiálních druhů

## „funkční“ próby

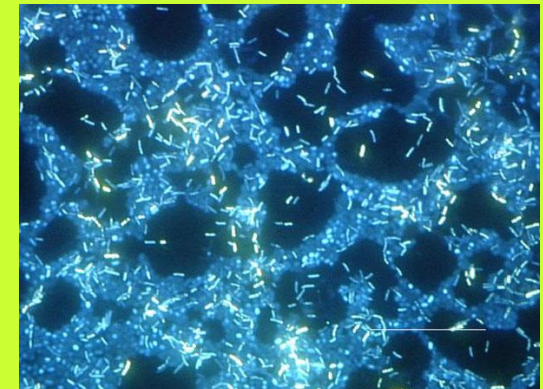
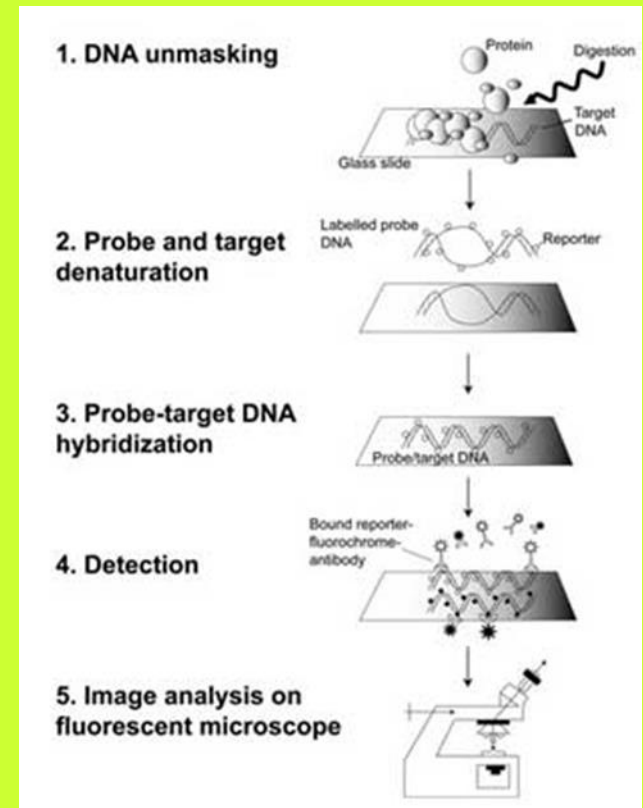
- pro hledání určitých vlastností dané populace



- Značení sond je provedeno obvykle jedním fluorescenčním barvivem,
- Možná aplikace i více sond značených různými fluorescenčními barvivy najednou
- Polynukleotidové próby (více než 50 nukleotidů) či proteinnukleotidové (PNA) - zvýšení specifičnosti a citlivosti analýzy
- Výhodné je jejich použití k detekci gram pozitivních bakterií
- Bylo popsáno i k detekci legionel přímo v nárůstech ve vodovodním potrubí

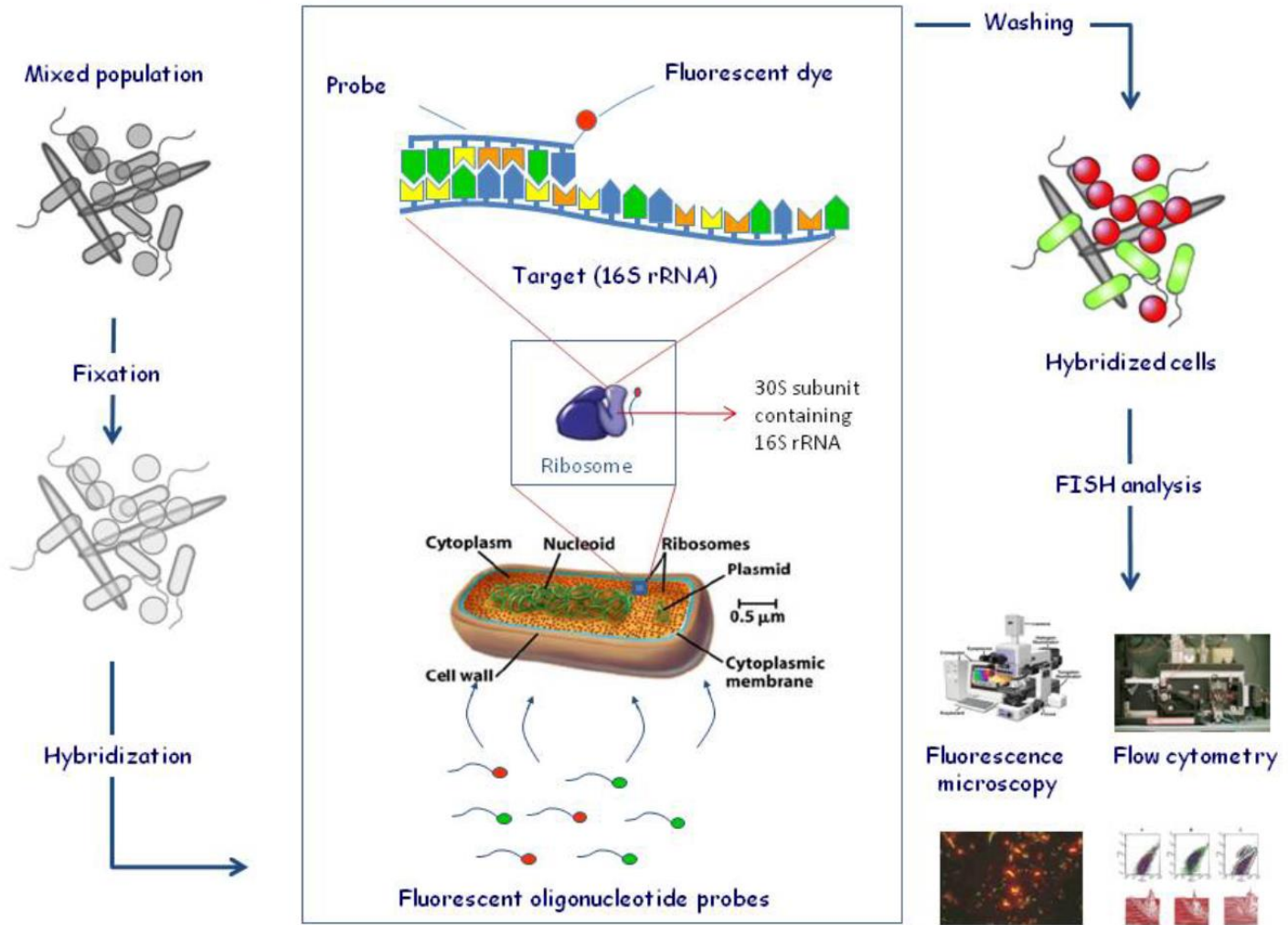
# Postup FISH

- fixace a zakoncentrování buněk ve vzorku
- denaturace DNA teplotou a formamidem v roztoku pufru
- hybridizace fluorescenčně značené DNA sondy se specifickým úsekem 16S nebo 23S rRNA
- navázání próby
- přesnost vytvoření dvoušroubovicové hybridní molekuly ovlivňuje teplota, koncentrace soli a pH hybridizační reakce
- vymytí nespecificky navázaných sond
- barvení DAPI pro určení totální abundance b.
- Kvantifikace pomocí fluorescenčního mikroskopu za použití vhodných filtrů, které zachytí emitované záření





# Fluorescent in situ Hybridization



evropský  
sociální  
fond v ČR



EVROPSKÁ UNIE



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,  
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY

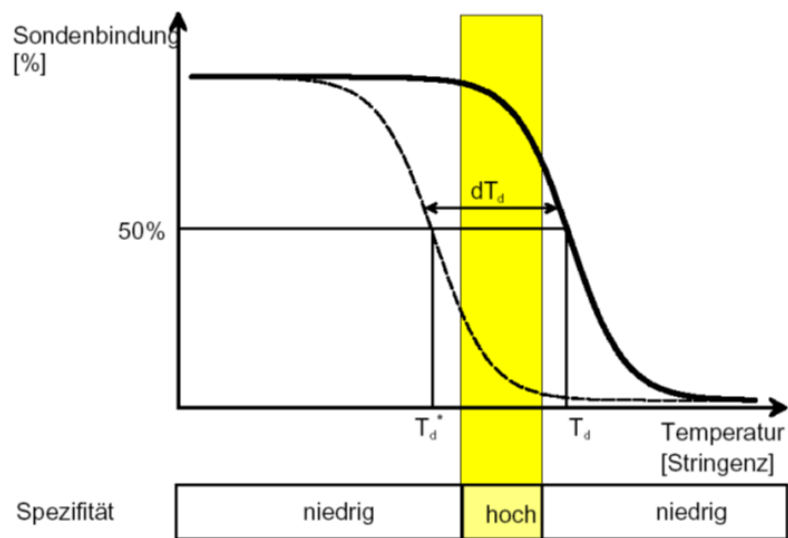


OP Vzdělávání  
pro konkurenceschopnost

INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

# Optimalizace podmínek hybridizace

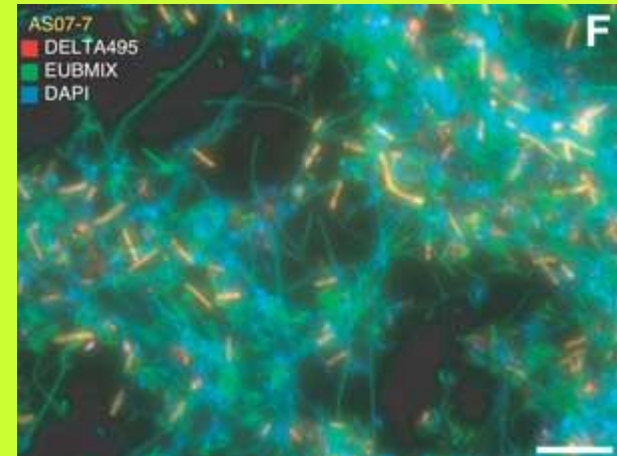
## Optimierung der Hybridisierungsbedingungen



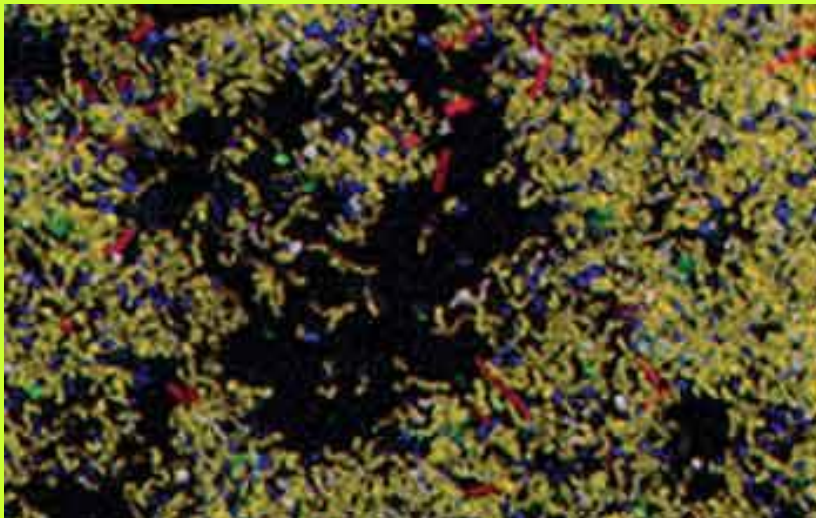
- stringence - termín pro popis stupně homologie mezi probou a DNA na filtru
- vyšší stringence = vyšší procento homologie mezi probou a NK
- specifita navázání závisí na podmínkách hybridizace a promývání
- určení optimální stringence - změna koncentrace formamidu v hybrid, pufru ve fixní teplotě spíše než změna hybridizační teploty

# Ne/výhody FISH

- FISH je rychlou, citlivou a specifickou metodou
- tam kde nedostačují klasické kultivační metody
- omezena pouze na pozorování metabolicky aktivních buněk s dostatečným množstvím rRNA
- Min. koncentrace  $10^3$  buněk/cm<sup>2</sup> membrány či filtru (síla signálu)
- Slabý signál - malé množství cílových rRNA molekul, nevhodná sonda nebo špatné pronikání sondy do buňky



Fluorescence in situ hybridization (FISH) photomicrographs of Acquasanta stream biofilm samples



This FISH image of the microbial biofilm (acidic drainage from a mine) shows the cells of *Leptospirillum* group II in yellow, *Leptospirillum* group III in white, archaea in blue, sulfobacillus in red, and eukaryotes in green. From the biofilm sample, two near-complete and three partial genomes were recovered.



evropský  
sociální  
fond v ČR



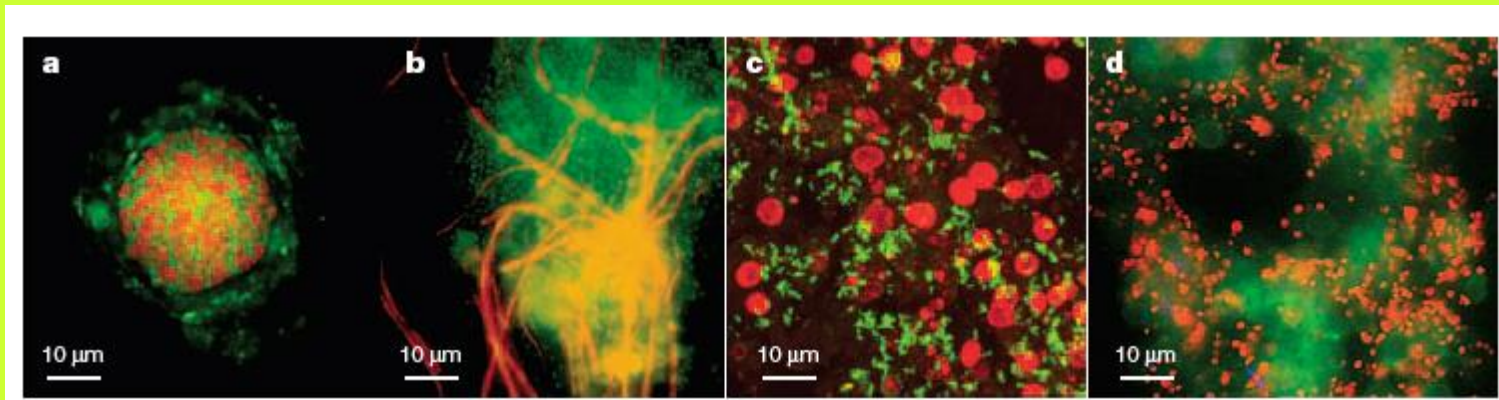
MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,  
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

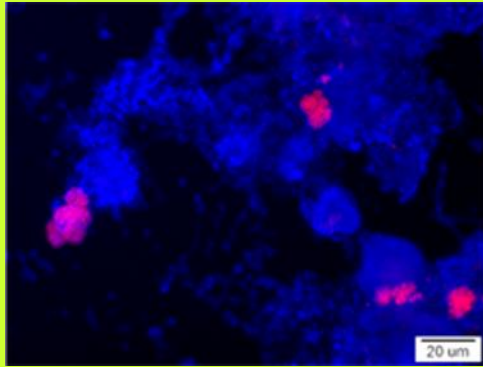
# FISH příklad

Visualization of uncultivated archaea in various environments by fluorescence in situ hybridization (Schleper et al., 2005)



- a) Euryarcheota (č) asociovaná se sulfát red. Bakteriemi (zel)
- b) Sladkovodní euryarcheon (z) asociovaný s Thiotrix (č)
- c) Crenarcheota (z) v tkáni houby r. Axinella (z)
- d) Crenarcheota (č) z povrchu kořenů rajčat

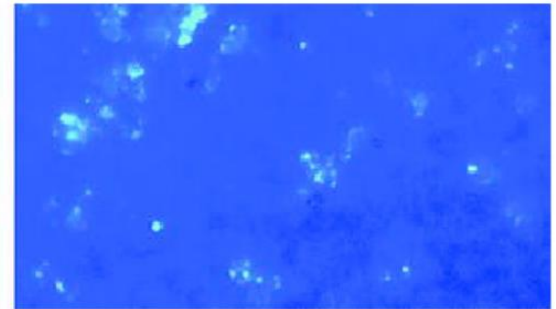
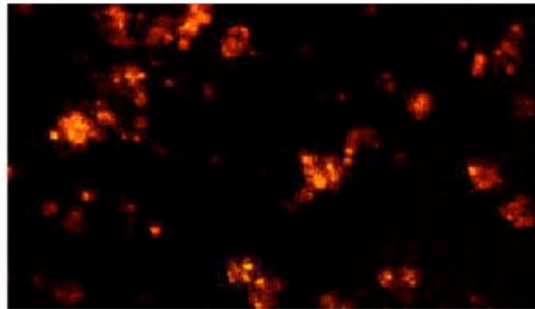
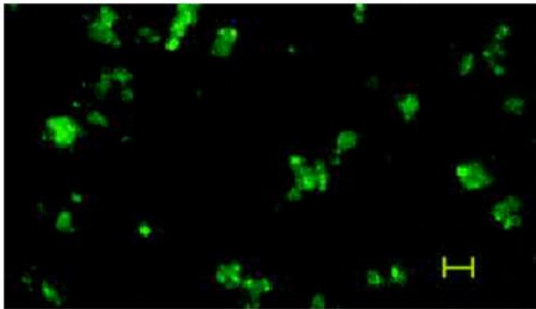




Klastry bakterie *Nitrosomonas oligotropha* detekované sondou Cluster6a192 (Cy3, červená) a celková DNA (DAPI, modrá)

Epifluorescence microphotograph of benthic microbes from Punto Sette. Scale bar 2μm, Green

Thermococcales detected by OregonGreen-labeled Tcoc164, red archaea detected by Cy3-labeled, blue DAPI-stained cells.



evropský  
sociální  
fond v ČR



EVROPSKÁ UNIE



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,  
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



OP Vzdělávání  
pro konkurenceschopnost

INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

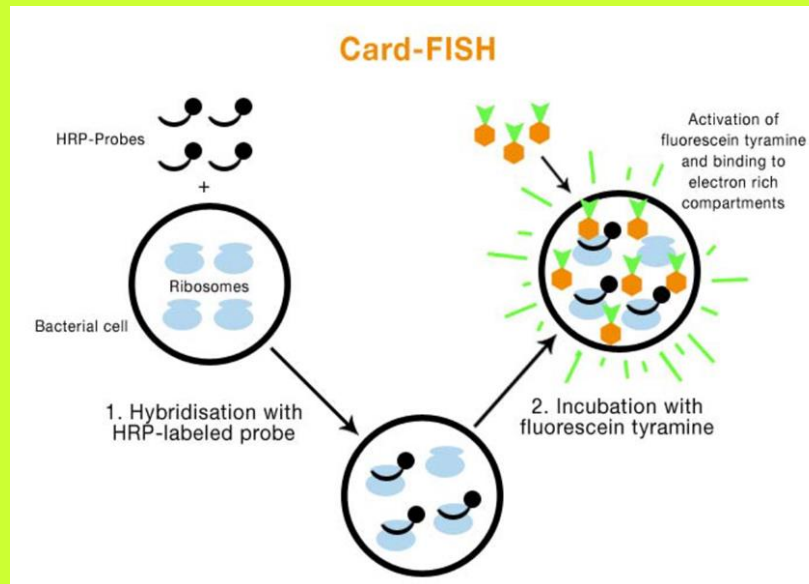
# CARD - FISH - Catalyzed Reporter Deposition Fluorescence in situ Hybridization

Hlavní princip CARD- FISH:

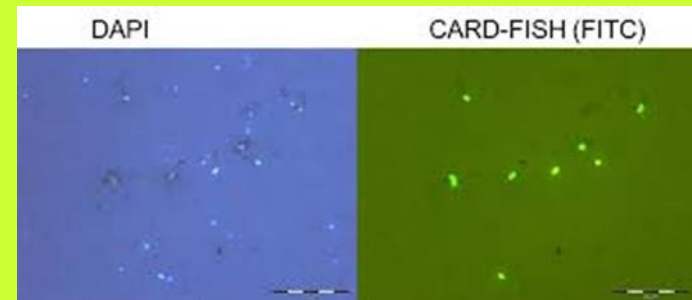
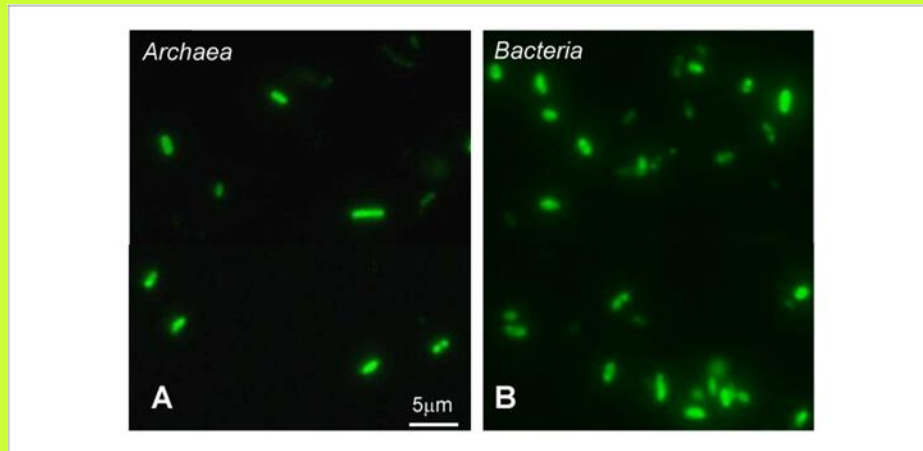
není užívána próba značená fluorescenčním barvivem, ale horseradish peroxidázou (HRP)  
- katalyzátor, který má v celém procesu zásadní význam, ale pod mikroskopem není vidět

⇒ po vlastní hybridizaci se ještě „jede“ CARD= označení míst s komplexem  
próba-HRP fluorescenčním barvivem

CARD: na hybridizované filtry se nechá působit směs s molekulami tyramidu značenými fluorescenčním barvivem- HRP je enzym, který způsobuje oxidaci tyramidu ⇒ tj. z molekuly tyramidu se stává reaktivní volný radikál, který se váže na „elektronově bohaté“ proteiny v okolí reakčního místa (uvnitř buňky protein, kam se podíváš)

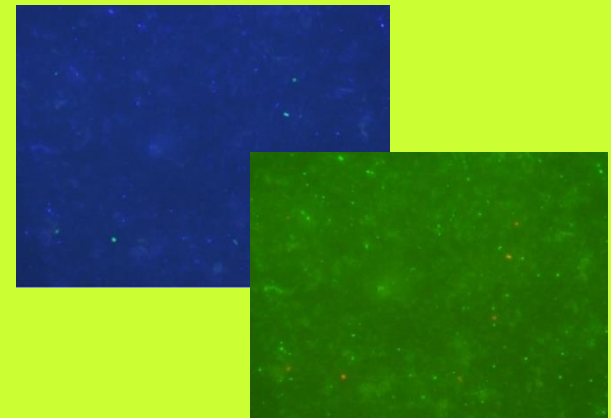
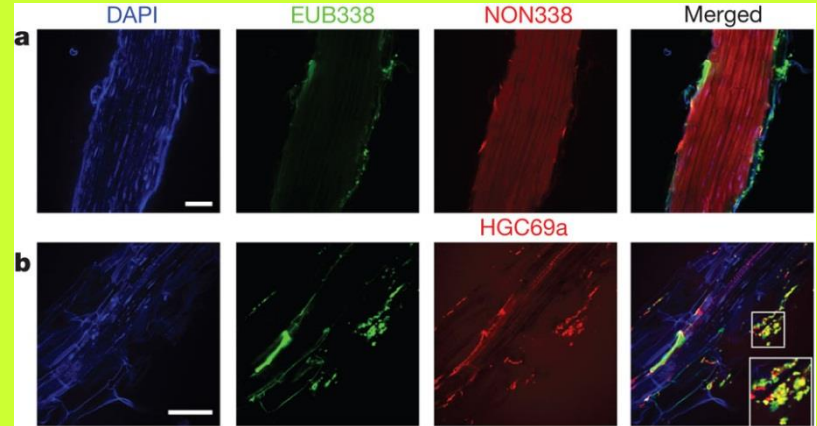


- tj. v okolí přisedlé próby s HRP přisedne na blízké proteiny v krátké době velké množství komplexů tyramid-barvivo ⇒ výrazné zesílení signálu
- HRP je velký enzym, takže před hybridizací musí být buňka lyzována (lysosym pro Eub, Proteináza K pro Arch) ⇒ aby NK zůstala uvnitř buňky a buňky na svém místě na filtru, musí se před lýzou fixovat na filtru do agarózy



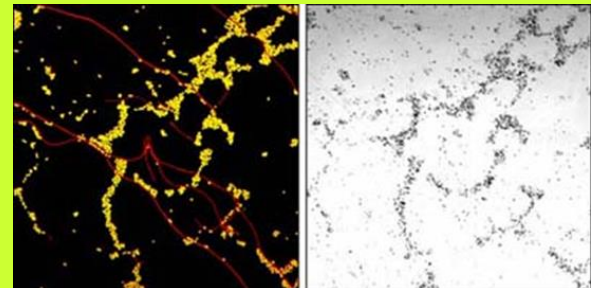
# Ne/výhody CARD-FISH:

- vyšší signál
- efektivita hybridizace vyšší než 50%
- skladování
- časově náročné
- finančně nákladné



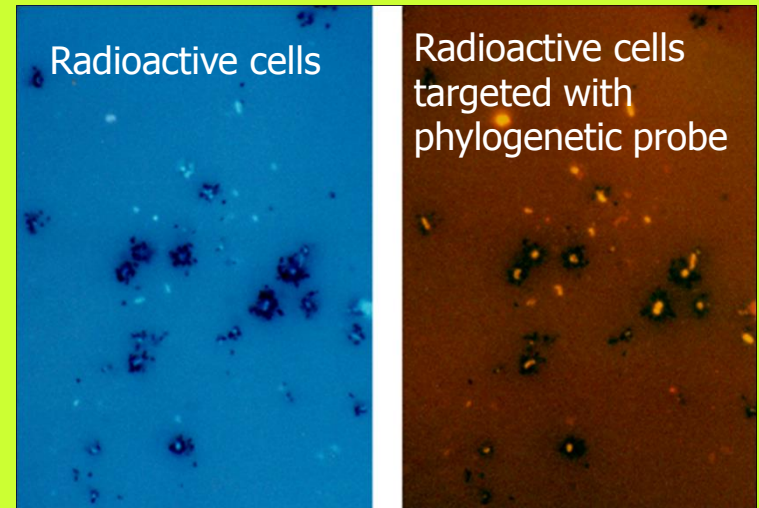
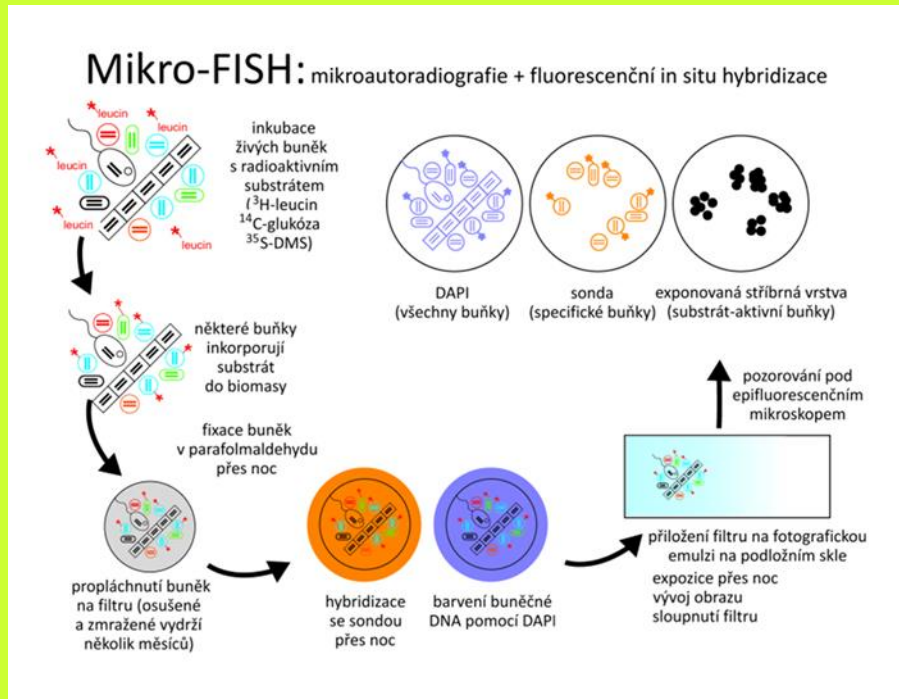
# MAR-FISH

- hlavním cílem mikrobiální ekologie je studium hojnosti, lokalizace a aktivity mikroorganismů in situ
- pochopení ekofyziologických role, kterou mikroorganismy hrají ve složitých přírodních ekosystémech
- v typických mikrobiálních společenstev - biofilmy, sedimenty a mikrobiální agregáty se fyzikálně-chemické podmínky a dostupnost zdrojů dynamicky mění v čase i ve velmi malé vzdálenosti, protože metabolická aktivita a doprava substrátu je omezená
- K přímé korelaci mezi mikrobiální identifikací (16S rRNA fylogenezi založenou) a specif. metabolickými funkcemi jednotlivých buněk v rámci těchto složitých a heterogenních mikrobiálních stanovišť, byly vyvinuty v posledním desetiletí nové metody
- Tyto techniky využívají in situ simultánní fylogenetické identifikace a metabolických schopnostech
- Microautoradiography - určení příjmu specifických radioaktivně značených substrátů jednotlivých buněk
- Fluorescenční in situ hybridizace (FISH) - umožňuje in situ fylogenetické identifikaci jednotlivých buněk. Ale neposkytuje dostatečné informace o metabolických schopnostech, protože fylogeneze a fenotyp se zřídka překrývají





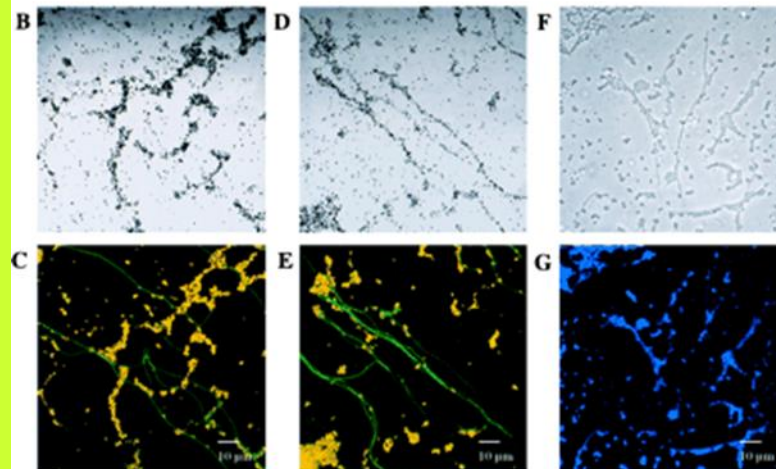
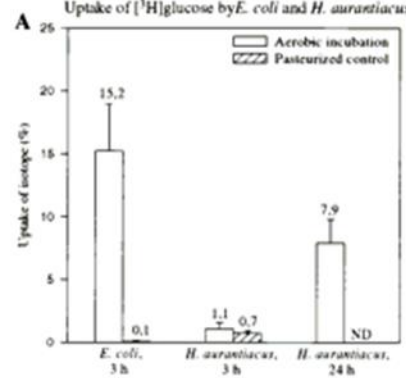
# MAR - FISH



MAR-FISH - mikroautoradiografie a FISH kombinovány současně zkoumání fylogenetické detekce konkrétní aktivity mikroorganismů v rámci komplexního mikrobiálního společenství na jedno-buněčné úrovni

# MAR-FISH

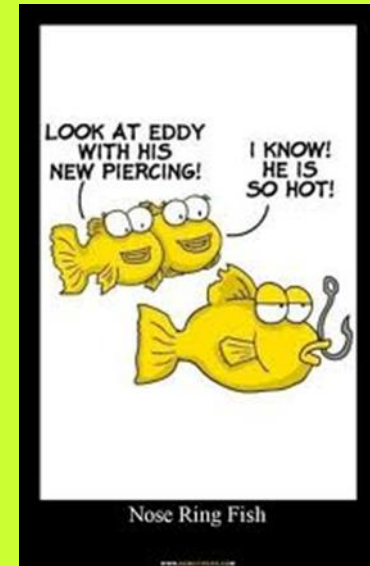
- Microautoradiography (Mar.) metabolicky aktivní buňky s využitím značený substrát může být zviditelněny expozicí záření citlivých stříbra halogenid emulze
- Po expozici, **excitované ionty stříbra vysráží jako černá zrna kovové stříbrné uvnitř nebo v blízkosti buňky, které lze pozorovat v transmisní elektronová mikroskopie**
- Běžně používané značeného substráty patří glukózy, acetát, a aminokyseliny, které poskytují obecný pohled na celkové metabolické rozmanitosti
- k identifikaci důležitých fyziologických procesů in situ- Například, značené železo nebo sulfát může v rámci řízených anaerobních podmínkách umožňuje identifikovat železo a sulfát redukující zástupce mikrobiální komunity
- MAR-FISH technika  
př. studium autotrofních nitrifikačních bakterie v biofilmu (Okabe et al. 2005)  
Příjem heterotrofních bakterií  $^{14}\text{C}$ -značených výrobků pocházejících z nitrifikačních bakterií byla přímo vizualizována MAR-FISH  
výsledky ukázaly, že členové Chloroflexi a Cytophaga-Flavobacterium hrají důležitou roli v odstraňování mrtvé biomasy a metabolitů nitrifikačních bakterií a brání hromadění organických odpadních produktů v biofilmu.
- STAR-FISH se liší od MAR-FISH pouze v metodologické, a základní princip metody stejný
- Kvantitativní MAR (QMAR)-FISH přístup, který dokáže detekovat i jednotlivé buňky



Radiometry and microautoradiography combined with FISH performed with pure cultures of *E. coli* and *H. aurantiacus*. (A) Liquid scintillation counts for viable and pasteurized *E. coli* and *H. aurantiacus* cells after incubation with [<sup>3</sup>H]glucose for 3 h. For *H. aurantiacus* [<sup>3</sup>H]glucose uptake was also determined after 24 h. ND, not determined. (B through E) Confocal laser scanning microscopic images of artificial mixtures of *E. coli* and *H. aurantiacus* incubated with [<sup>3</sup>H]glucose and analyzed by a combination of microautoradiography and FISH by using Cy3-labeled probe *GAM42a* (red) and Cy5-labeled probe *EUB338* (colored green by image analysis). (B) Microautoradiographic image of *E. coli* and *H. aurantiacus* after 3 h of incubation with [<sup>3</sup>H]glucose. (C) Whole-cell hybridization of the microscopic field in panel B. *E. coli* cells appear yellow because of the overlapping labels. (D) Microautoradiographic image of *E. coli* and *H. aurantiacus* after 3 h (*E. coli*) and 24 h (*H. aurantiacus*) of incubation with [<sup>3</sup>H]glucose. (E) Whole-cell hybridization of the microscopic field in panel D. (F and G) Confocal laser scanning microscopic images of an artificial mixture of pasteurized *E. coli* and *H. aurantiacus* cells incubated with [<sup>3</sup>H]glucose for 3 h and analyzed by a combination of microautoradiography (F) and DAPI staining (G). Since no silver grain formation was observed in the pasteurized control sample, cell morphologies were determined by using the transmission mode of the confocal laser scanning microscope.

# Další modifikace FISH

- mnoho dalších modifikací technologie FISH
- Odlišnosti v sekvenci, značení prób a jejich kombinacích
- „fibre FISH“ rozlišení pouze 1000 nukleotidů
- „multiplex FISH“ - zvýraznit několik desítek sekvencí DNA v rámci jednoho buněčného jádra)
- RING-FISH: polynucleotidové RNA proby
- „RNA FISH“ - fluorescenční barvivo váže na konkrétní typ RNA molekul v buňce (sledování transkripce)
- „QuantiGene ViewRNA FISH“ detekce a kvantifikace molekul mRNA, lncRNA a miRNA
- „Stellaris FISH“ Single Molecule RNA FISH, detekce a kvantifikace molekul mRNA nebo jiných dlouhých molekul RNA v tenké vrstvě tkáně
- Flow-FISH využívá flow cytometrii
- <http://www.pnas.org/content/108/10/4152.full.pdf+html>



evropský  
sociální  
fond v ČR



EVROPSKÁ UNIE  
MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,  
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



OP Vzdělávání  
pro konkurenceschopnost

INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ





WHOI microbiologist Stefan Sievert and colleagues used FISH, or Fluorescence In Situ Hybridization, to localize and identify the microbes living in different parts of the gill chambers of shrimp living near hydrothermal vents. In the FISH technique, short stretches of nucleic acids tagged with different fluorescent labels bind to the DNA of specific microbes. This image shows two kinds of bacteria attached to a hair-like structure called a seta on the mouth appendages of the shrimp *Rimicaris exoculata*. The **ring-shaped seta** (seen here in cross-section) appears **blue**. Short, thin **Gammaproteobacteria** appear **red**, and longer, stouter **Epsilonproteobacteria** appear **green**. The scientists are working to determine whether these bacteria convert energy from chemicals in hydrothermal fluids into biomass that the shrimp can use as an energy source.





# Extrakce a izolace nukleových kyselin z přírodních vzorků

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

Extrakce a izolace

Purifikace

Molekulárně-biologická analýza

## Nepřímá izolace DNA/RNA:

oddělení buněk od zbytku půdy nebo jiné matrice před jejich lyzí

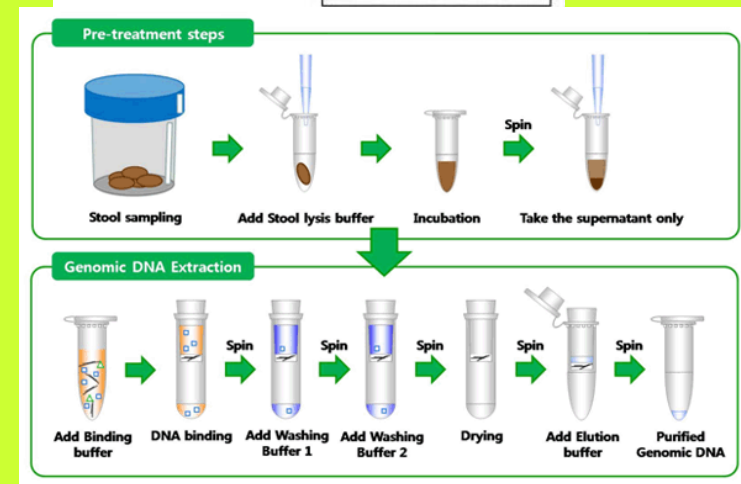
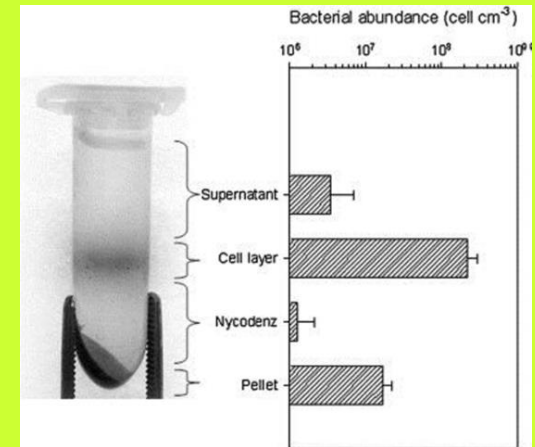
pracnější a časově náročnější  
Nycodenz gradient centrifugation  
CsCl gradient

## Přímá izolace DNA/RNA:

promývání půdního vzorku

drcení, sonikace, enzymatická lyze

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



evropský  
sociální  
fond v ČR



EVROPSKÁ UNIE



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,  
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



OP Vzdělávání  
pro konkurenceschopnost

INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

# Extrakce a izolace nukleových kyselin

## 1) Buněčná lyze:

### Chemicky

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

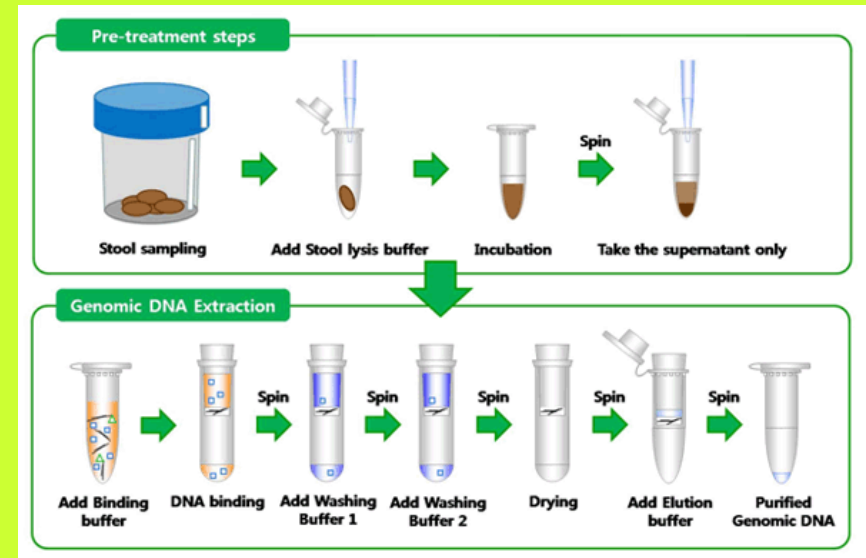
### Enzymaticky

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

### Fyzikálně

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

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



evropský  
sociální  
fond v ČR



EVROPSKÁ UNIE  
MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,  
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



OP Vzdělávání  
pro konkurenceschopnost

INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

# Hodnocení kvality a kvantity NK

## Kvantita:

Horizontální gelová elektroforéza

agarózový gel (0.8 - 1%)

TAE, TBE pufry

žebříček molekulových vah - marker

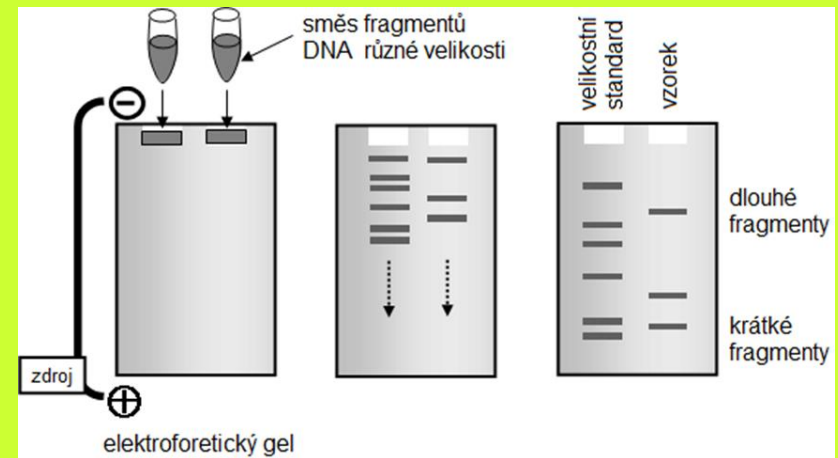
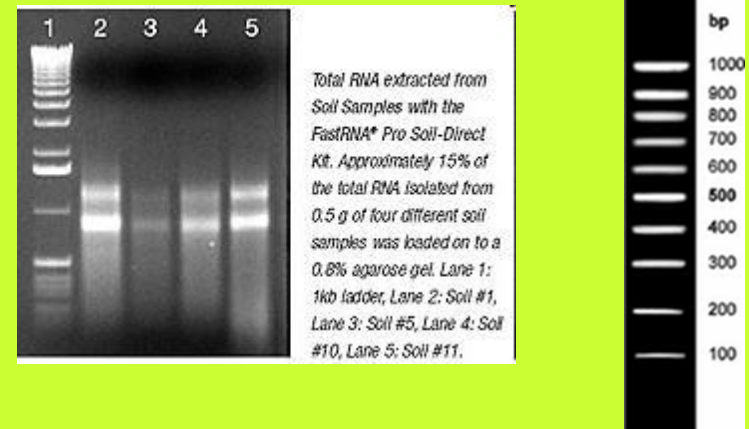
odhad množství NK, které použijeme pro následné aplikace

## Kvantifikace:

fluorometricky

(SYBRGreen, HOECHST dye)

spektrofotometricky (nanodrop, picodrop, spectrophotometers)



Gelová elektroforéza je metoda, která odděluje jednotlivé fragmenty DNA na základě jejich pohybu gelem. Pohyb je způsoben elektrickým polem směr a rychlost pohybu je dán nábojem molekul, jejich velikostí a tvarem a rovněž velikostí náboje elektrického pole a složením gelu DNA je nabitá záporně, bude se tedy pohybovat ke kladnému konci

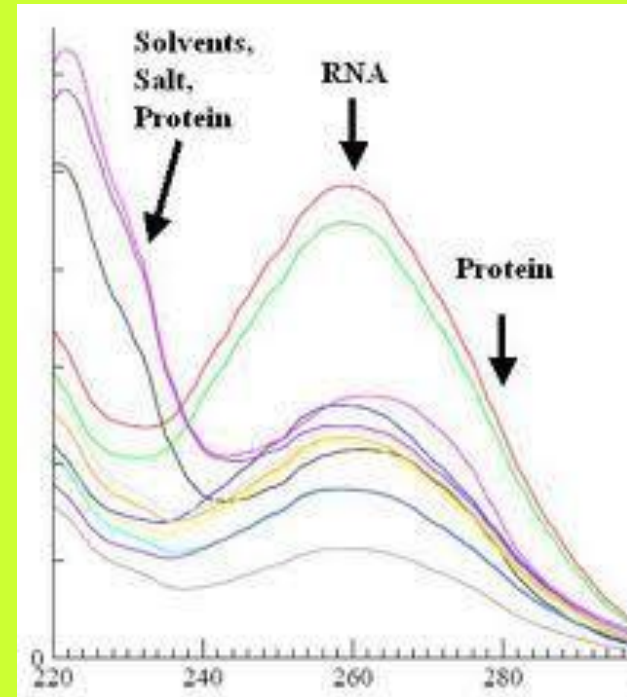
# Spektrofotometrické měření koncentrace DNA/RNA

Měří se absorbance při vlnové délce 260 nm, případně celé spektrum (220 - 320 nm) - umožňuje např. Nanodrop:

- *dsDNA*:  $C = A_{260}/0.02$  [ $\mu\text{g}/\text{ml}$ ]
- *ssDNA*:  $C = A_{260}/0.027$  [ $\mu\text{g}/\text{ml}$ ]
- RNA:  $C = A_{260}/0.025$  [ $\mu\text{g}/\text{ml}$ ]

Sleduje se také poměr absorbancí **A260/A280**:

- Určuje čistotu vzorku NK
- DNA optimální čistoty, pokud **A260/A280  $\geq$  1.8**





# Simultánní extrakce DNA a RNA

J. Rajendhran, P. Gunasekaran / Biotechnology Advances 26 (2008) 576–590

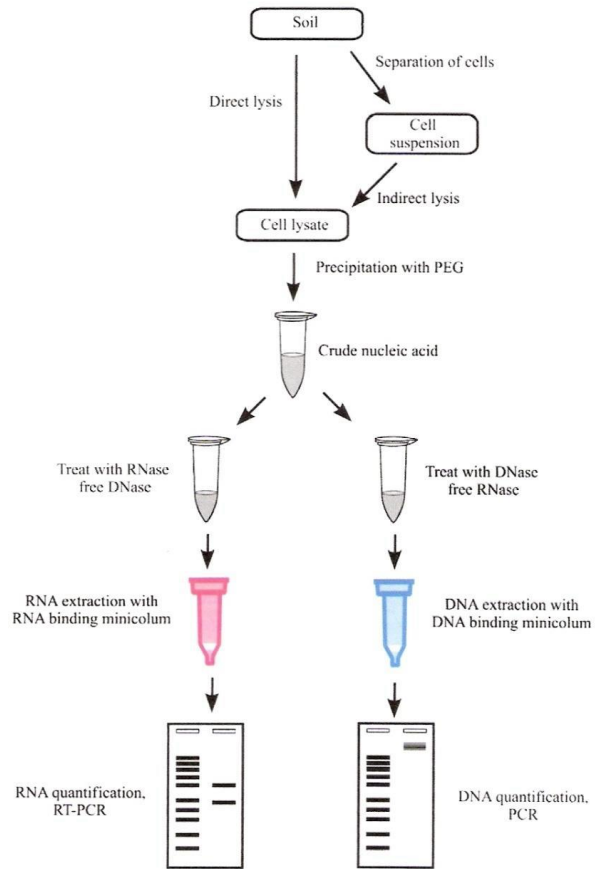


Fig. 3. Simultaneous recovery of RNA and DNA.

Odhad poměru **aktivní versus celkové** biodiversity: **poměr**

**RNA/DNA**

- **množství DNA** v buňce je stabilní - odhad biomasy (počet přítomných buněk)
- **množství RNA** se mění v závislosti na buněčném cyklu a používá se k odhadu metabolické aktivity

**Pomalý růst: RNA/DNA << 1**



evropský  
sociální  
fond v ČR



EVROPSKÁ UNIE



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,  
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



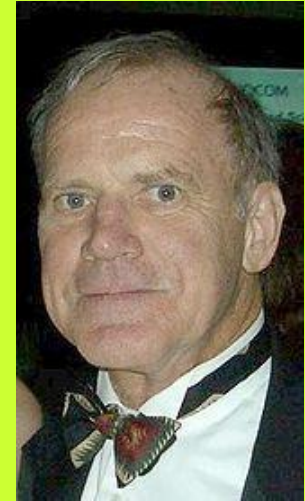
OP Vzdělávání  
pro konkurenceschopnost

INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

# PCR polymerázová řetězová reakce

Kary Banks Mullis - 1993 Nobel Prize

- umožňuje v krátkém času namnožit daný kus DNA bez pomoci buněk
- za několik hodin je schopna metoda PCR vyprodukovat kolem miliardy kopií DNA
- PCR se sestává ze tří kroků, při kterých se množství DNA zvětšuje exponenciálně
- klíčovým enzymem je DNA-polymeráza z *Thermus aquaticus*, žijícím v horkých pramenech Yellowstonekého národního parku
- Taq polymeráza je odolná vůči vysokým teplotám a zůstává aktivní přes mnoho cyklů
- vysoká rychlost i selektivita reakce



# Princip PCR

## 1. Denaturace

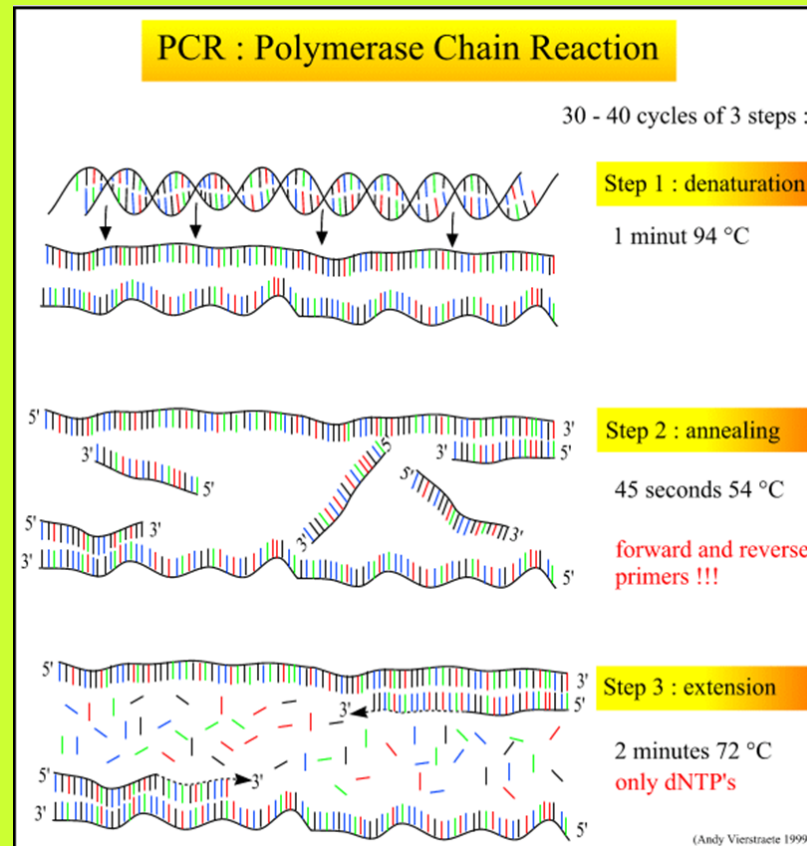
- 94°C - 96°C
- teplem se poruší vodíkové vazby a oba řetězce DNA se oddělí

## 2. Annealing

- ochlazení směsi na 50°C - 65°C
- primery se navážou na cílovou DNA vodíkovými můstky podle pravidel komplementarity

## 3. Extenze

- 72°C
- DNA-polymeráza přidává nukleotidy k 3' koncům primerů, jako při obvyklé replikaci
- cyklus trvá pouze cca 5 minut
- dvojnásobné množství cílové DNA, dlouhé i stovky párů bází
- třicet cyklů - teoreticky miliarda kopií



evropský  
sociální  
fond v ČR



EVROPSKÁ UNIE



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,  
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



OP Vzdělávání  
pro konkurenceschopnost

INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

# PCR primery, skladování produktů

## Primer

- synteticky vyrobené molekuly jednořetězcové DNA (20-30 nukleotidů)
- jsou komplementární ke koncům DNA, která má být amplifikována
- determinují místo na DNA, které má být zmnoženo

### Optimální primer...

- 14-20 b
- 40-60% G+C
- G-C a A-T páry rovnoměrně rozmístěné
- annealingová teplota 55-65°C
- netvoří vlásenky
- specifický pro cílovou sekvenci

### Optimální pár primerů...

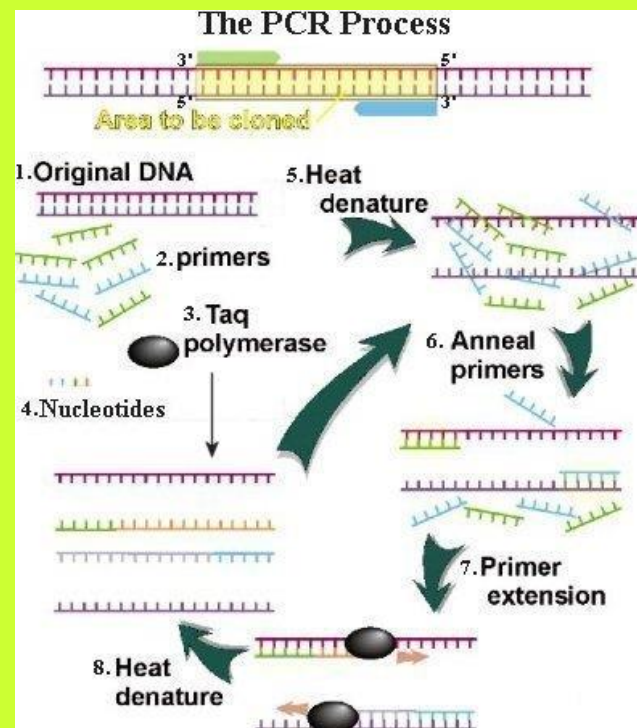
- rozdíl  $T_m$  menší než 3°C
- netvoří 3'dimery

### Uchovávání DNA

- krátkodobé 4°C (do 1 týdne)
- střednědobé -20°C (aliquoty!)
- dlouhodobé -80°C (roky)

### Uchovávání RNA

- krátkodobé -20°C
- dlouhodobé -80°C



evropský  
sociální  
fond v ČR



EVROPSKÁ UNIE



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,  
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY

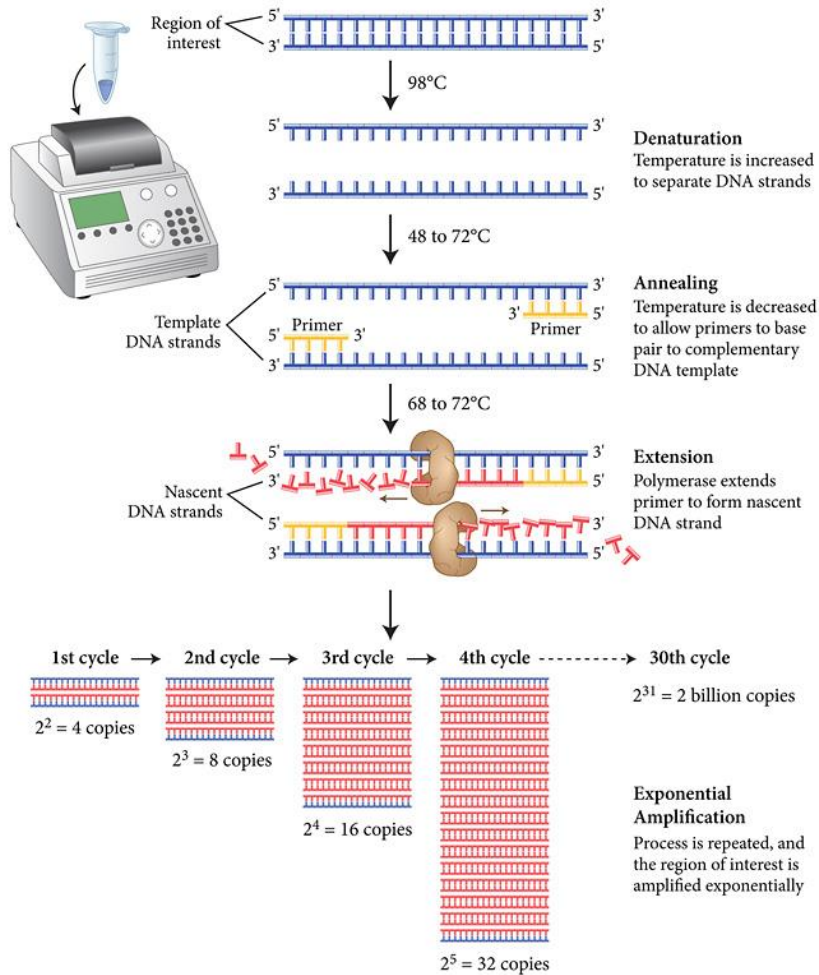


OP Vzdělávání  
pro konkurenceschopnost

INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ



# PCR



COMPONENT	VOLUME	FINAL CONCENTRATION
1. autoclaved ultra-filtered water (pH 7.0)	20.7 $\mu$ L	-
2. 10x PCR Buffer*	2.5 $\mu$ L	1x
3. dNTPs mix (25 mM each nucleotide)	0.2 $\mu$ L	200 $\mu$ M (each nucleotide)
4. primer mix (25 pmoles/ $\mu$ L each primer)	0.4 $\mu$ L	0.4 $\mu$ M (each primer)
5. Taq DNA polymerase (native enzyme)	0.2 $\mu$ L	1 Unit/25 $\mu$ L
6. genomic DNA template (100 ng/ $\mu$ L)	1.0 $\mu$ L	100 ng/25 $\mu$ L

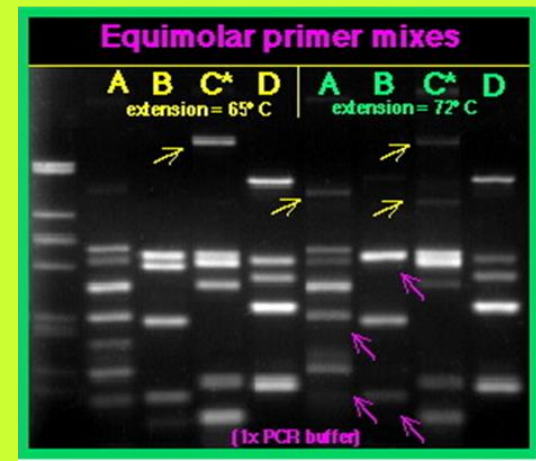
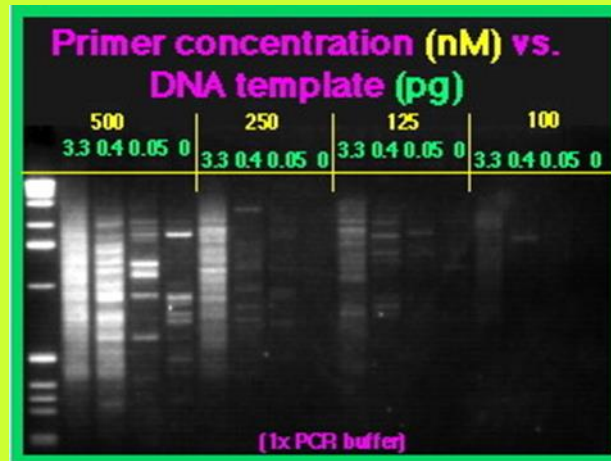
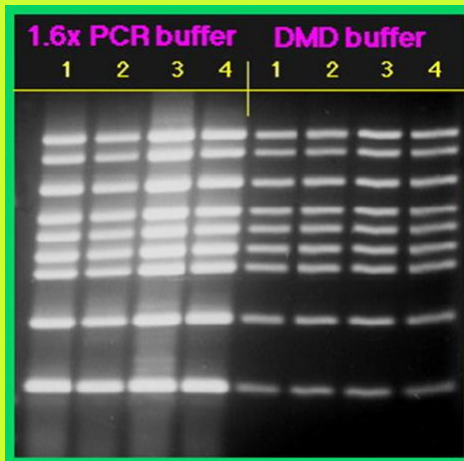
# Ovlivnění PCR

- Kvalitní templát (DNA, RNA) bez inhibitorů reakce



- Specifické primery
- Složení PCR mastermixu (množství primerů, Mg iontů, nukleotidů...)
- Vhodný standard
- Stanovení pozadí, účinnosti reakce

- některé živočišných tkání obsahují množství nukleáz
- půdy obsahují inhibitory typu huminové kyseliny
- forenzní genetika (problém malého množství materiálu - kontaminace vlastními NK)



# Multiplex PCR

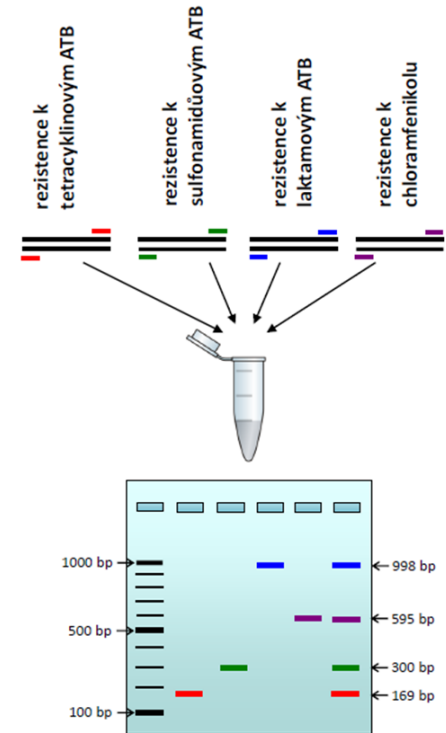
## Multiplexová reakce

testování mnoha delecí a bodových mutací v jedné amplifikační reakci

je nutno vypracovat takové reakční podmínky (sekvence nukleotidů, koncentrace primerů, optimální teploty jednotlivých kroků cyklu atd.)

## Multiplex (mnohonásobná) PCR

- popsána poprvé v r. 1988
- modifikace klasické PCR
- je použito více párů specifických primerů komplementárních k různým cílovým sekvencím v jedné amplifikační reakci
- umožňuje tak amplifikaci několika genů v 1 reakci
- šetří čas a peníze



© Lucie Kotřová



evropský  
sociální  
fond v ČR



EVROPSKÁ UNIE



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,  
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



OP Vzdělávání  
pro konkurenceschopnost

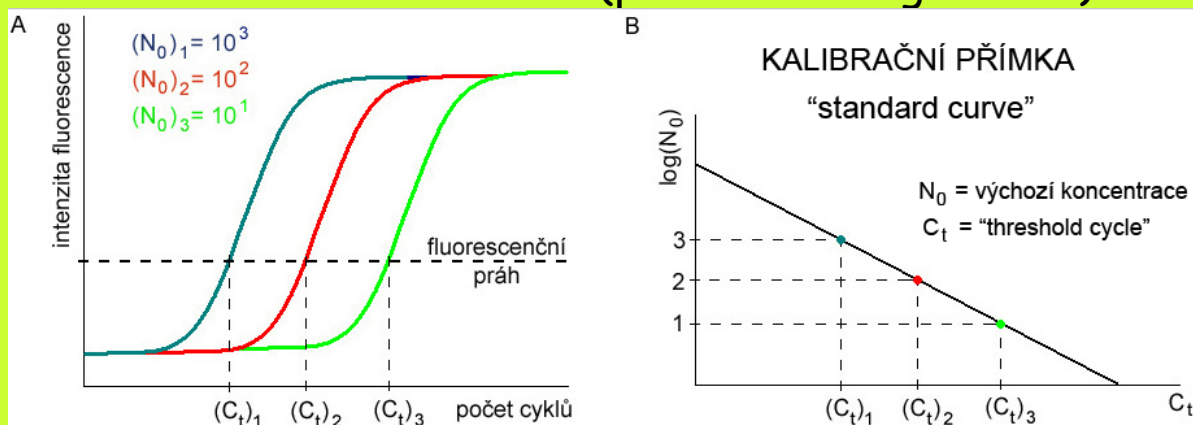
INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

# RealTime - PCR

- Množství vytvořeného PCR produktu sledováno v každém cyklu
- Pomocí fluorescenčních barviv a thermocyklerů s optikou

## Aplikace:

- Jako klasická PCR, s vyšší citlivostí a specificitou
- Kvantifikace genu ve vzorku vyzolované DNA nebo RNA (qPCR)
- Detekce mutací, Single nucleotide polymorphism (SNP)
- Detekce chromozomálních aberací (prenatální diagnostika)





# RealTime - PCR

Množství amplifikované DNA měřeno v každém cyklu jako příbytek fluorescence

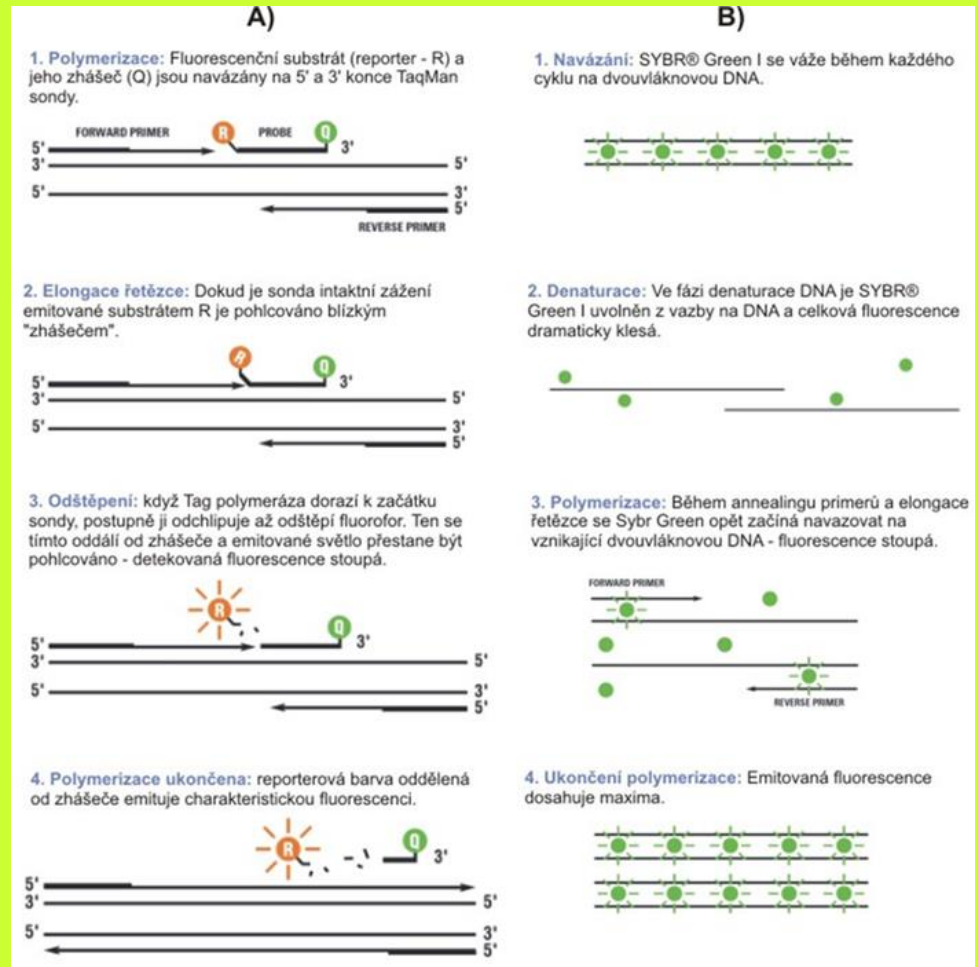
Amplifikace zřejmá po určitém počtu cyklů PCR, který je nepřímě úměrný počáteční kvantitě stanovovaného genu ( $N_{ct} = N_0 \times 2^{ct}$ )

Porovnání se standardem o známém počtu kopií stanovovaného genu umožní kvantifikaci

Fluorescenční barvivo, které se nespecificky naváže na dsDNA

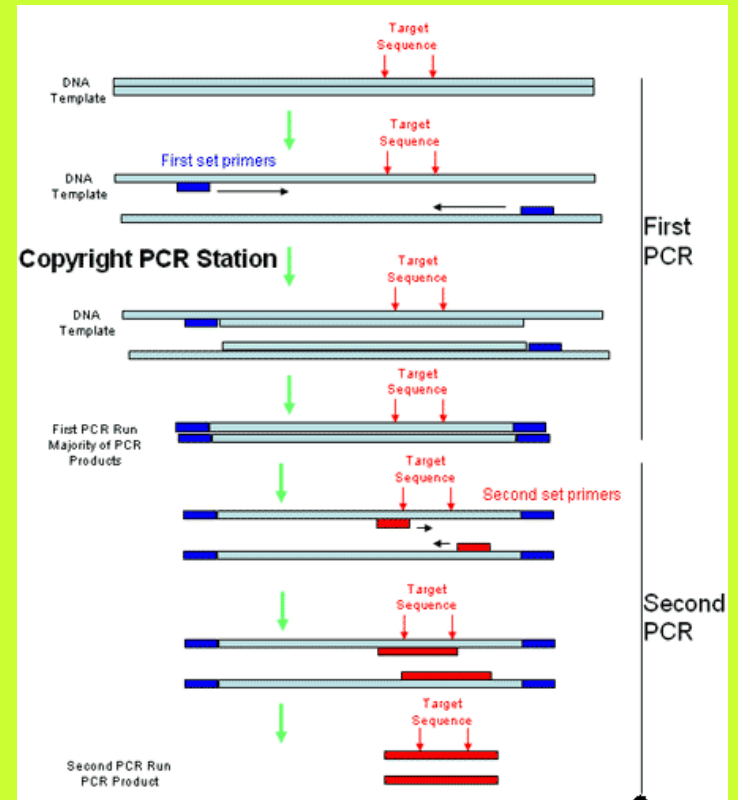
• SYBR Green (excitace  $\lambda = 497$  nm, emise  $\lambda = 520$  nm)

• specificky značené sondy



## „Nested“ PCR

- Amplifikuje se nejprve úsek, kde templátem je genomická DNA
- Následuje další PCR zv. „nested“ reakce, kde templátem je produkt reakce předcházející
- Pro první reakci se použije první sada oligonukleotidů, v druhé, „nested“ reakci se použijí oligonukleotidy, které jsou navrženy pro fragment získaný jako produkt první PCR



## Asymetrická PCR

- preferenční syntéza jenom jednoho vlákna z duplexu DNA
- jeden z primerů je v nadbytku, produkt PCR - jednovláknová DNA
- vhodná např. pro sekvenování

**SSPR** (*single strand producing reaction*), která je ještě specifitější. Tato metoda se také vhodně kombinuje s „nested“ PCR

# Příklady využití PCR

- namnožení DNA z 40 000 let starého srstnatého mamuta
- namnožení mtDNA neandrtálce
- forenzní věda - namnožení nepatrného množství DNA z dějiště zločinu
- namnožení DNA z jednotlivých embryonálních buněk v rámci prenatální diagnostiky
- namnožení virové DNA z buněk, ve kterých se dá jinak jen těžko prokázat přítomnost viru, jako je HIV

