

## EKO/MEM - Molekulární ekologie mikroorganismů

Fingerprinting mikrobiálního společenstva  
(DGGE/TGGE, RFLP, T-RFLP, AFLA, ARDRA, (A)RISA)



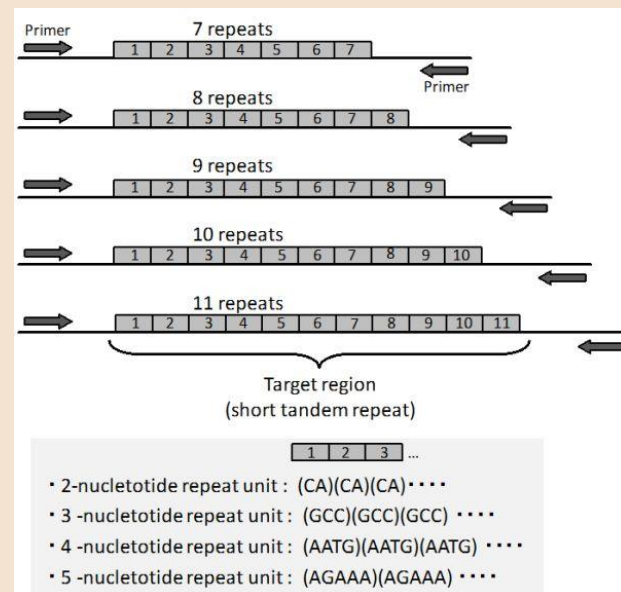
EKO/MEM - Molekulární  
ekologie mikroorganismů



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

# DNA fingerprinting - genetická daktyloskopie

- metoda forenzní chemie, která umožňuje díky unikátnosti sekvence DNA každého z nás spolehlivě určit, zdali daný úsek DNA patří hledanému člověku.
- 1985 potvrdil unikátnost individuálních jedinců tým kolem Aleca Jeffreyse
- našli určitá místa na DNA podléhají polymorfismu
- metody na izolaci a analýzu těchto částí lidské DNA
- Polymorfismus důležitý pro genetickou daktyloskopii se nachází v junk-DNA
- Tyto části se liší svou délkou a sekvencí
- Některé sekvence se dokonce několikrát opakují
- A právě po opakujících sekvencích forenzní analýza pátrá...



# Fingerprinting mikrobiálního společenstva

Stanovení profilu diverzity mikrobiálního společenstva pomocí technik mol. biologie

Odhad množství variant genu ve společenstvu

- předpoklad: každá odlišná varianta genu představuje odlišný typ mikrobů

Celkový pohled na společenstvo, neřekne nic o přímé identifikaci nebo počtech individuálních buněk

Využití

- studium mikrobiálních systémů (vodní ekosystémy, půdy, lidská mikroflóra) - měření biodiverzity, změny ve společenstvu v čase, vliv faktorů..... sukcese společenstva, environmentální narušení habitatu, odpověď na znečištění polutanty

Adv Biochem Engin/Biotechnol (2011) 124: 151–181  
DOI: 10.1007/10\_2010\_82  
© Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2010  
Published Online: 11 November 2010

## Resolution of Natural Microbial Community Dynamics by Community Fingerprinting, Flow Cytometry, and Trend Interpretation Analysis

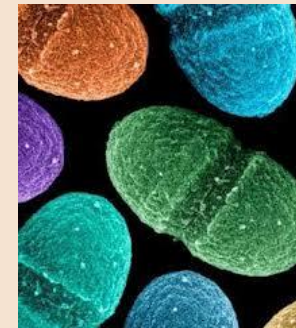
Petra Bombach, Thomas Hübschmann, Ingo Fetzer, Sabine Kleinstüber, Roland Geyer, Hauke Harms and Susann Müller

**Abstract** Natural microbial communities generally have an unknown structure and composition because of their still not yet cultivable members. Therefore, understanding the relationships among the bacterial members, prediction of their behaviour, and controlling their functions are difficult and often only partly successful endeavours to date. This study aims to test a new idea that allows to follow community dynamics on the basis of a simple concept. Terminal restriction fragment length polymorphism (T-RFLP) analysis of bacterial 16S ribosomal RNA genes was used to describe a community profile that we define as composition of a community. Flow cytometry and analysis of DNA contents and forward scatter characteristics of the single cells were used to describe a community profile, which we define as structure of a community. Both approaches were brought together by a non-metric multidimensional scaling (n-MDS) for trend interpretation of changes in the complex community data sets. This was done on the basis of a graphical evaluation of the cytometric data, leading to the newly developed Dalmatian plot tool, which gave an unexpected insight into the dynamics of the unknown bacterial members of the investigated natural microbial community. The approach presented here was compared with other techniques described in the literature. The microbial community investigated in this study was

P. Bombach, T. Hübschmann, I. Fetzer, and S. Kleinstüber are contributing authors to the same extent.

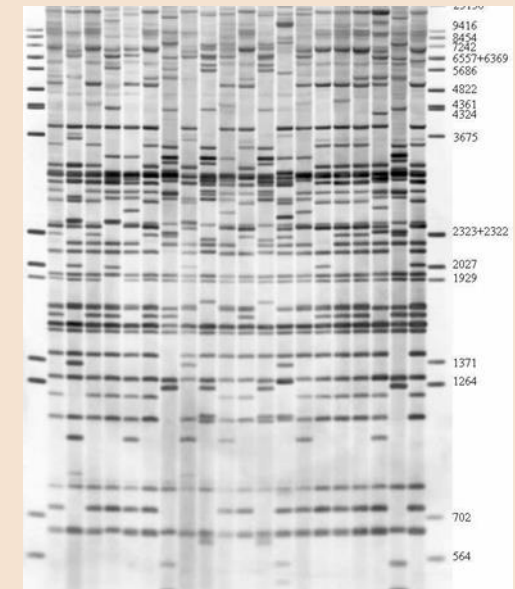
P. Bombach  
Department of Isotope Biogeochemistry, UFZ, Helmholtz Centre for Environmental Research, Permoserstr. 15, 04318 Leipzig, Germany  
T. Hübschmann, I. Fetzer, S. Kleinstüber, H. Harms and S. Müller (✉)  
Department of Environmental Microbiology, UFZ, Helmholtz Centre for Environmental Research, Permoserstr. 15, 04318 Leipzig, Germany  
e-mail: susann.mueller@ufz.de

R. Geyer  
Tecan Trading AG, Seestrasse 103, 8708 Männedorf, Switzerland



# Fingerprinting

- Extrakce celkové DNA z environmentálního vzorku - mix genetického materiálu ze všech mikrobů přítomných ve vzorku
- Cílem analýzy je určitý gen nebo oblast DNA
- předpoklad - každý mikrobiální druh bude mít specif. variantu tohoto genu/oblasti - tvoří tzv. fylotyp
- Cílové geny jsou vybírány v závislosti na informaci, kterou chceme získat
- Častým cílem geny kódující 16S rRNA nebo geny které mají klíčovou roli v metabolických procesech



# Výhody & nevýhody fingerprintigových metod

## Výhody

- Relativně rychlá a levná metoda
- Analýzy velkého množství vzorků najednou
- Velmi výhodná pro sledování změn společenstva v čase
- Metody fingerprintingu nevyžadují mít *a priori* sekvenční data pro jeden typ organismu ve vzorku

## Nevýhody

- Výsledky převážně kvalitativní, nikoli kvantitavní data → obtížnější srovnání kvalitativních dat studií různých
- Fingerprinting společenstva neidentifikuje taxony - výstupy dat některých technik (DGGE) lze využít pro další analýzy vedoucí k taxon. identifikaci



Nízká reprodukovatelnost výsledků získaných přes metody fingerprintingu  
Nepřesný odhad abundance  
Nezachycení vzácných taxonů

Eg.: DGGE nedekuje mikroby tvořící méně než 0,5 - 1% komunity

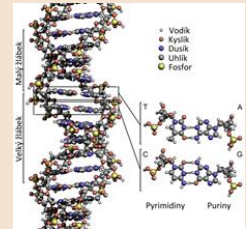


# Fingerprintové techniky

Studium mikrobiálních společenstev *in situ*

## 1. Separace na základě odlišnosti tání DNA fragmentů (DGGE/TGGE/SSCP)

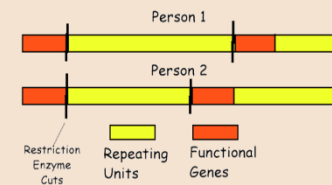
- Posloupnost nukleotidů
- obsah GC párů
- ovlivňují průběh tání fragmentu DNA a následně rychlost migrace v denaturačním gradientu (zvyšující se teplota, nebo koncentrace denaturantů)



## 2. Délkový polymorfismus

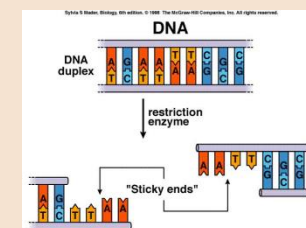
**Přirozený** - založené na VNTR (Variable Number of Tandem Repeats)

- -RISA/ARISA - společenstva



**Vytvořený pomocí restričních enzymů** (restriční endonukleázy) - ARDRA, RFLP/T-RFLP

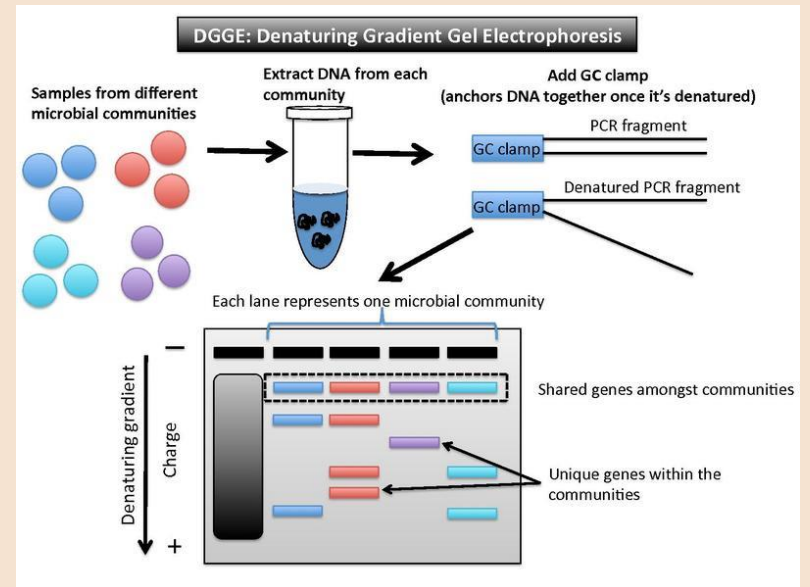
- Lze využívat kapilární gelové elektroforézy (zvýšení rozlišení a detekce) a automatizovat metodu



# DGGE/TGGE

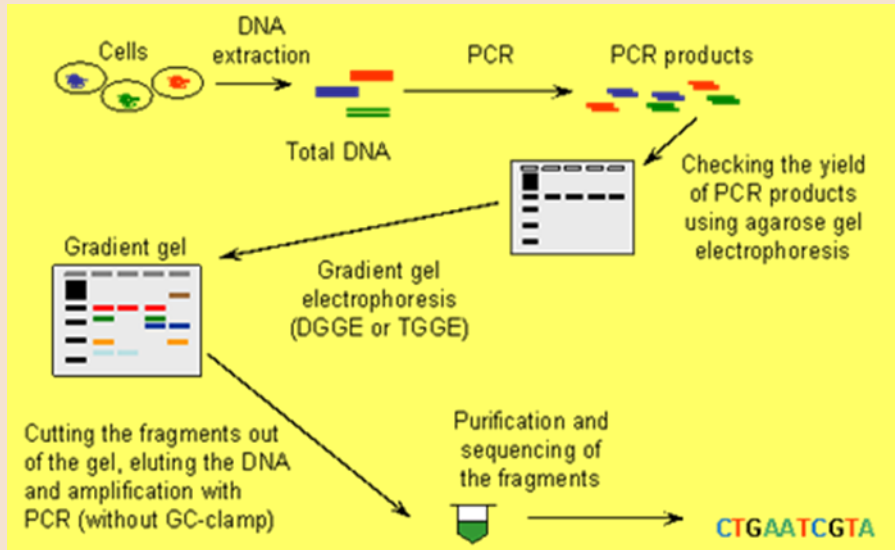
- denaturační gradientová gelová elektroforéza (DGGE)
- teplotní gradientová gelová elektroforéza (TGGE)
- molekulární metoda - tzv. separační metody (1983), cíl DNA
- princip - změna elektroforetické mobility částečně rozpojených molekul v polyakrylamidovém gelu s gradientem denaturantů (formamid, močovina)/teploty
- využití v medicíně - detekce genových mutací, citlivost téměř 100%
- mikrobiální ekologie - analýza málo diverzifikovaných přírodních společenstev, odhad diverzity (bakterie, sinice, řasy, houby ...)
- DGGE/TGGE umožňuje identifikovat vybrané dominantní skupiny, např. vyříznutím bandy, reamplifikací a sekvenováním, a tím poskytuje informace i o dosud neznámých skupinách, pokud jsou amplifikovány

- Aplikace ke studiu:
- celkového společenstva: univerzální primery (geny 16S rRNA)
- charakterizace funkčních skupin: specifické primery - (např. amoA, 16S rRNA, mcrA)

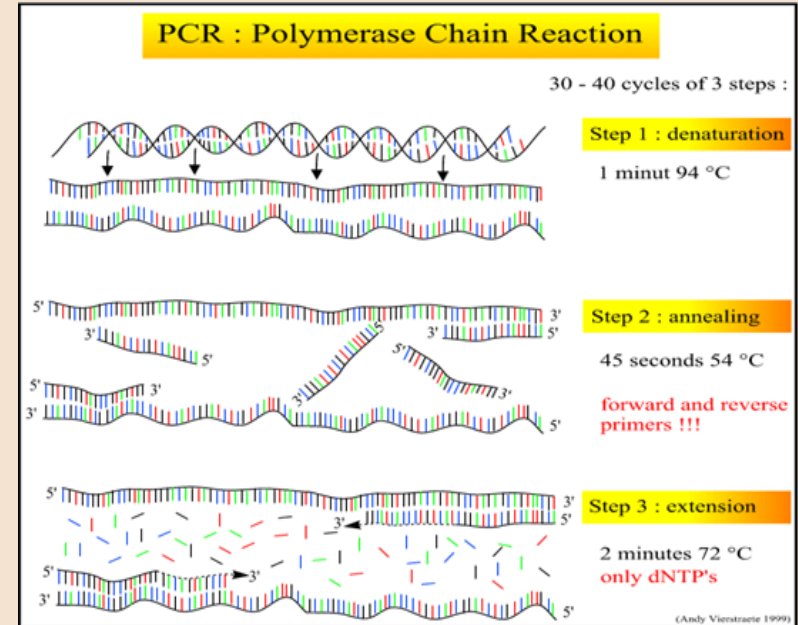


# DGGE - princip

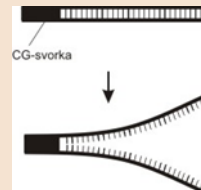
- izolace DNA ze vzorku



- PCR



- PCR primery s GC svorkou - zcela oddělené ssDNA by vytvořily neostré proužky, používají se při amplifikaci DNA primery s tzv. CG-svorkou

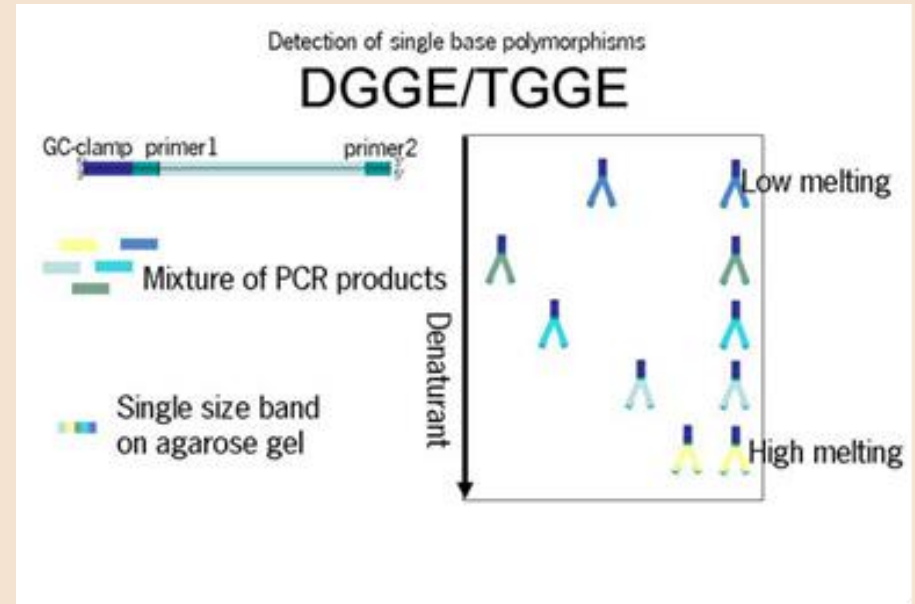
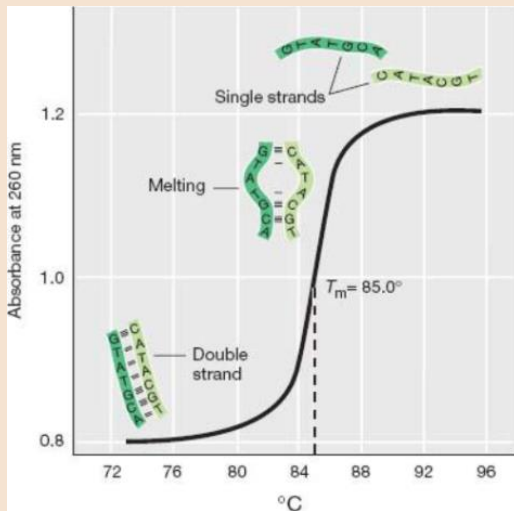


- PCR produkt pak obsahuje dvoušroubovice, které mají na jednom konci samé CG páry - v tomto místě se řetězce denaturují jen nesnadno



# DGGE - princip

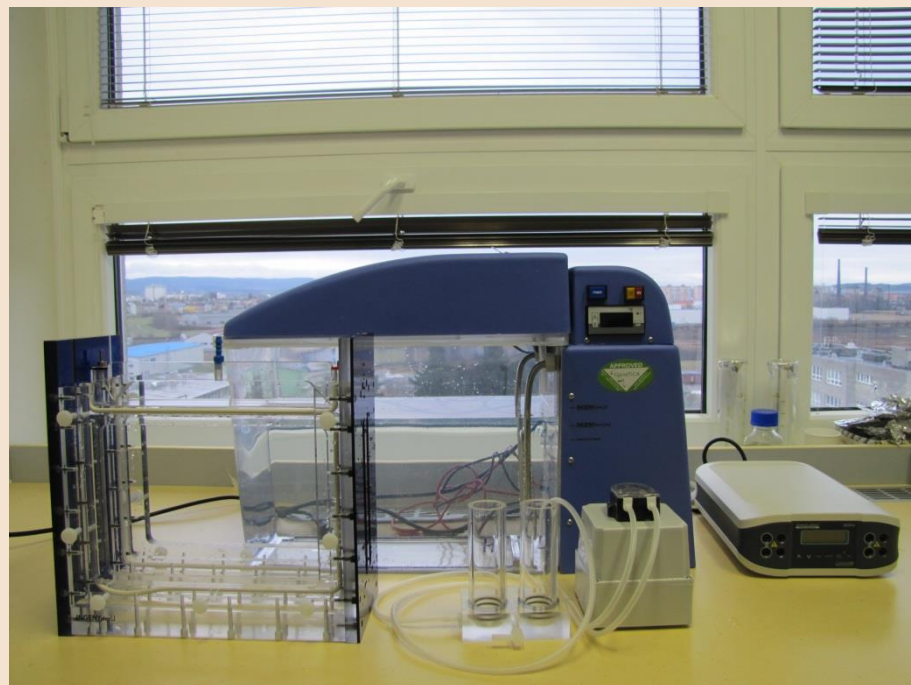
- vyšetřovaná DNA putuje v elektrickém poli rychlostí, která odpovídá její molekulové hmotnosti, až do okamžiku, kdy se oba řetězce začnou od sebe oddělovat
- vznikající denaturovaná vlákna putují při elektroforéze mnohem pomaleji, takže čím snáze se určitý úsek denaturuje, tím blíže startu se vzorek DNA zastaví



- řetězce DNA se od sebe budou snáze oddělovat v místech bohatých na AT páry, úseky bohaté na CG budou stabilnější
- rychlost denaturace DNA závisí na počtu vodíkových můstků

# DGGE v praxi

- výběr gelu s vhodným gradientem denaturantů a hustotě - závisí na velikosti fragmentů, nutná optimalizace
- příprava dvou roztoků s nízkou a vysokou koncentrací denaturantů (rozdíl min. cca 10-20 %)
- gradient maker - nalévání gelu za tvorby gradientu denaturantů
- teplota pufru 50 - 65° C
- doba 3 - 20 hodin, 50 - 250 V
- po vychladnutí barvení fluorescenčním barvivem (Sybr green, ethidium bromid, aj.)
- vizualizace pomocí transiluminátoru
- analýza obrazu, stanovení diverzity - počet bandů, vyřezávání bandů - klonování



# Př. DGGE analýza metanogenů v sedimentech říčky Sitky

- odběr sedimentu pomocí freeze - core
- podélný profil , 5 lokalit (délka úseku cca 30 km)
- vertikální profil, lok. č. IV - 5 profilů po 10 cm
- izolace DNA pomocí komerčních kitů (adsorpce na silikát)
- PCR - primery s GC kotvou zachycující metanogenní archea (Watanabe 2004)
- (problém: množství celkové DNA vs. množství cílové DNA )
- gel s gradientem denaturantů 45 - 60 %,
- 16 hodin, 85 V



evropský  
sociální  
fond v ČR



EVROPSKÁ UNIE



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,  
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



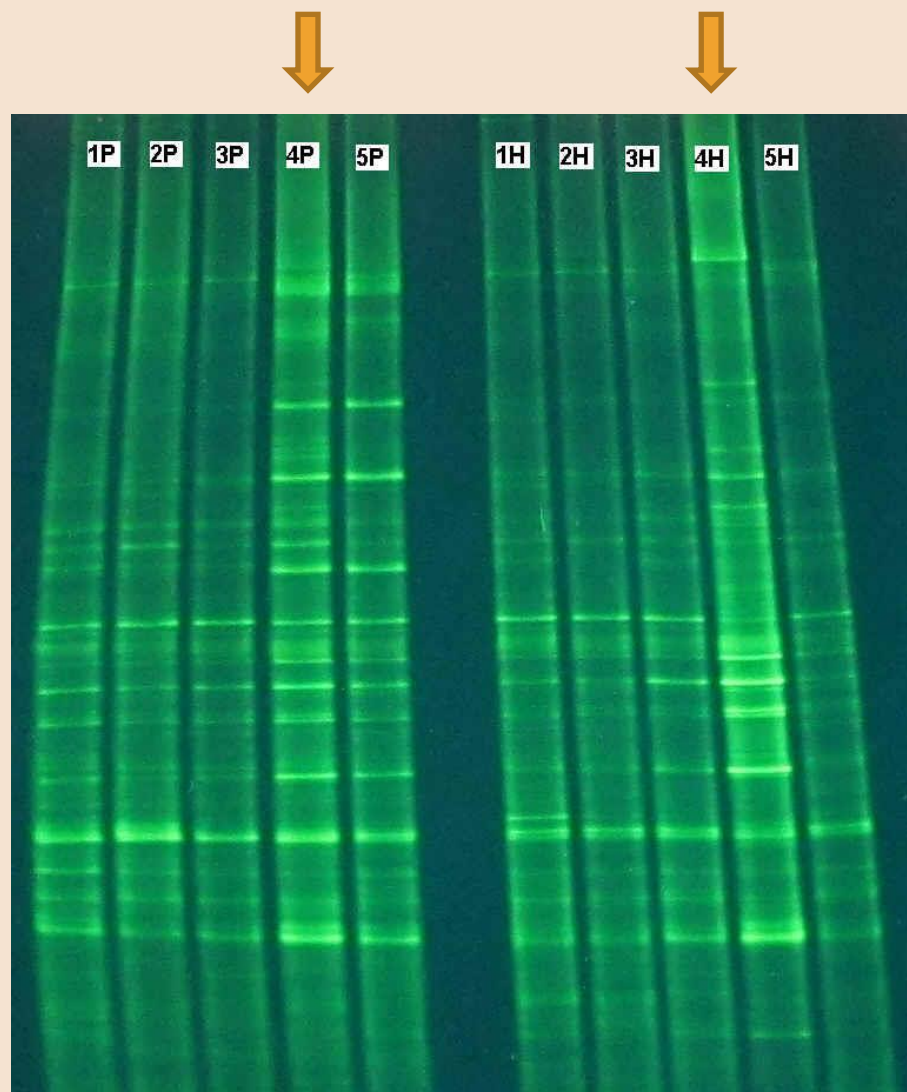
OP Vzdělávání  
pro konkurenceschopnost

INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ



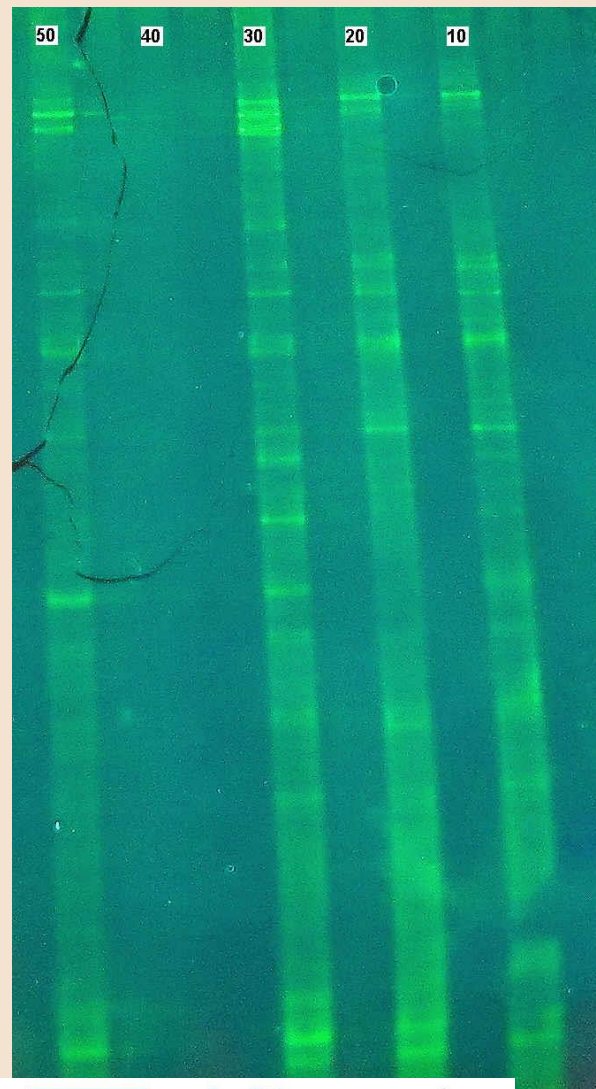
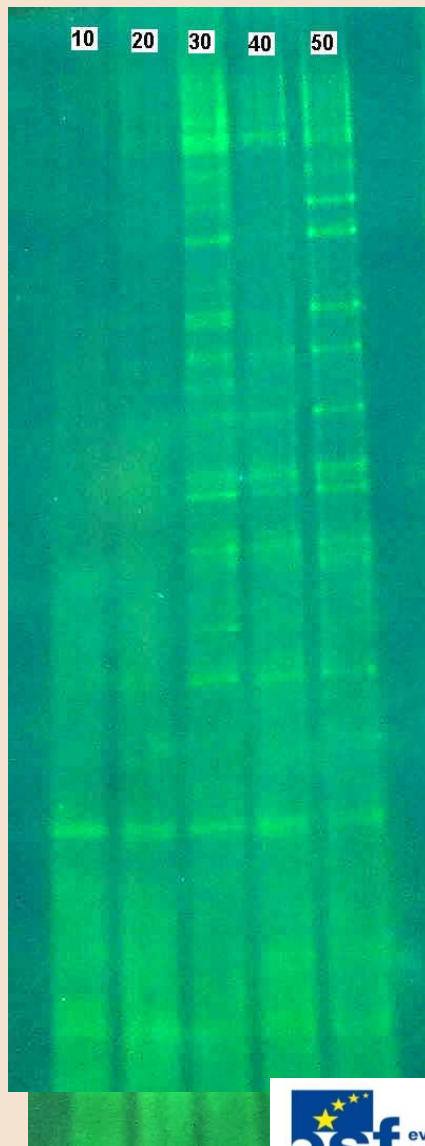
# Prvotní výsledky DGGE analýzy metanogenů v sedimentech říčky Sitky

- podélný profil Sitky
- lokalita 1 - 5 po spádu toku
- P - „povrch“ (cca 0 - 25 cm)
- H - „hloubka“ (cca 25-50 cm)
- přítomnost metanogenů prokázána na všech lokalitách
- malé rozdíly v kvantitě
- výraznější v kvalitě
- nejbohatější lokalita 4 - odpovídá produkci metanu i detekci metanogenů pomocí FISH



# Prvotní výsledky DGGE analýzy metanogenů v sedimentech říčky Sitky

- vertikální profil 4. lokality
- sediment po freeze-core separován po 10 cm do hloubky 50 cm
- dosavadní výsledky nelze signifikantně hodnotit
- odhadujeme cca 15 - 20 různých fylogenetických taxonů - odpovídá předběžným výsledkům výsledků klonování mcr genu z této lokality

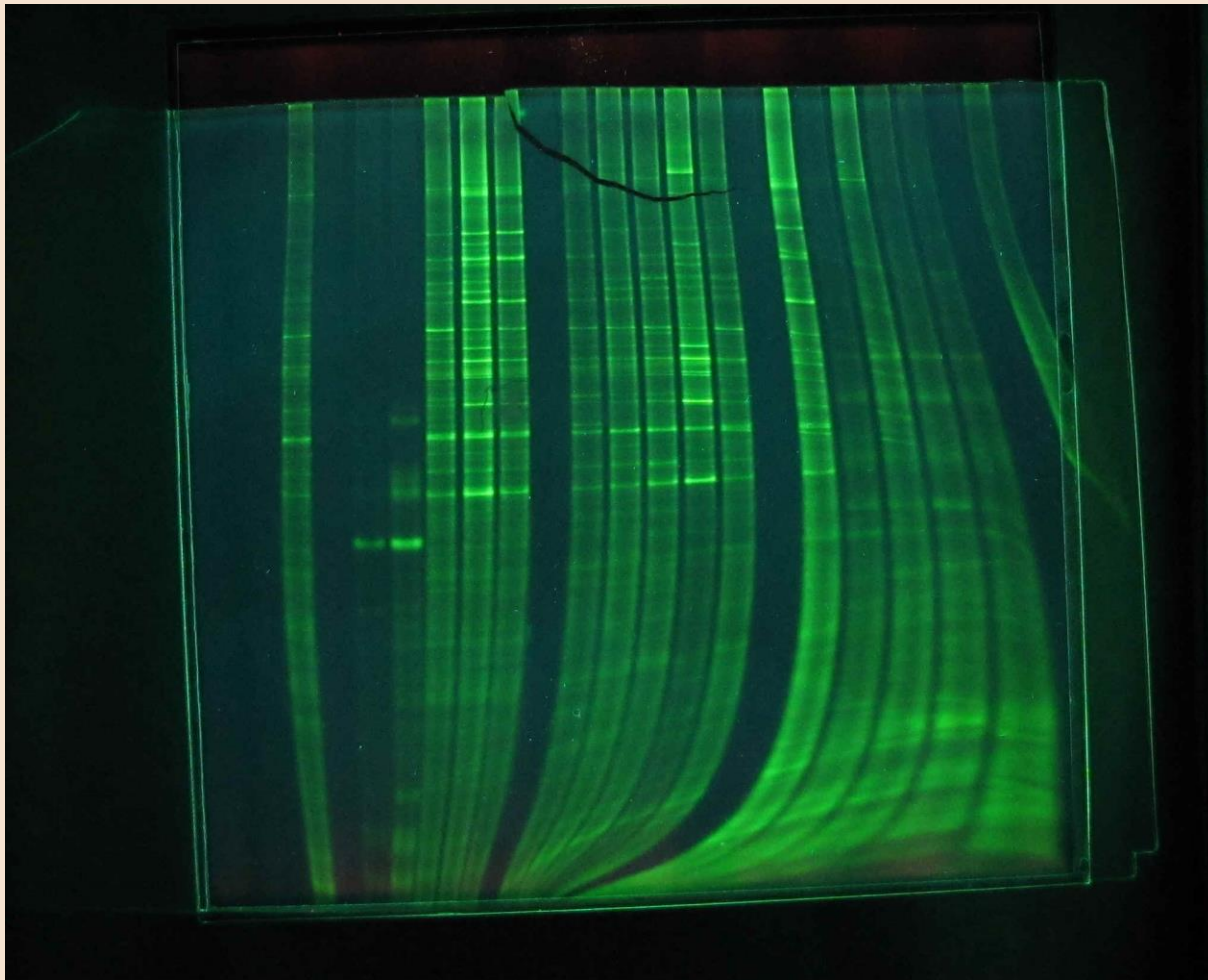


Vyřezání proužku a identifikace:

- 1.Reamplifikace
- 2.Separace na DGGE
- 3.Znovu vyřezání / nebo sekvenování / nebo klonování



DGGE - první bitvy vyhrány, válka ještě nekončí...



evropský  
sociální  
fond v ČR



EVROPSKÁ UNIE



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,  
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



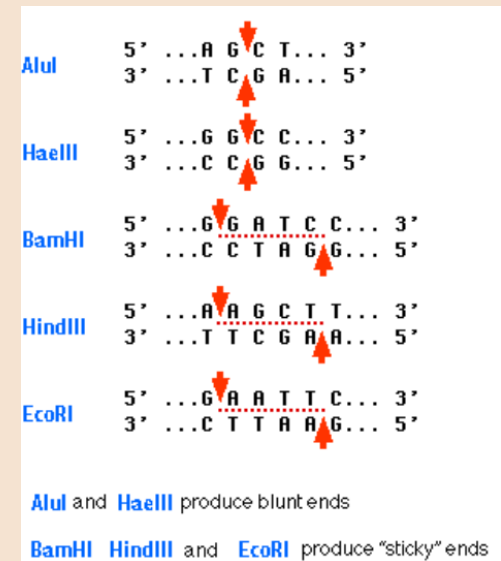
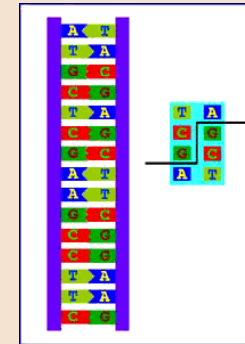
OP Vzdělávání  
pro konkurenceschopnost

INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

# Restrikční metody

= tzv. restriktasy („ nůžky - DNAsy štěpící specifické sekvence“),  
cca 1500 restriktáz

- Využívá bakteriálních endonukleas (restriktas), které dokáží štěpit DNA, pokud obsahuje určitou přesně definovanou sekvenci nukleotidů.
- Bakterie se pomocí těchto enzymů brání před infekcí viry: virová DNA může být snadno rozštěpena, na rozdíl od vlastní nukleové kyseliny, která je před degradací chráněna methylací
- Úsek DNA, který bude endonukleasou rozpoznán a štěpen, je dlouhý zpravidla jen několik párů bazí a často jde o palindromickou sekvenci.
- Jednotlivé endonukleasy se liší podmínkami, za nichž optimálně pracují. Mnoho z nich pracuje při vyšších teplotách, v roztocích s vyšším obsahem solí apod.



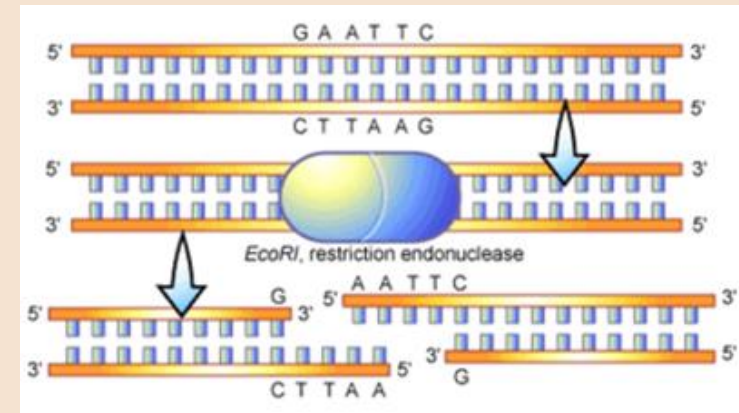
Geny odvozené od různých populací se liší:

- v sekvenci DNA v místech pro štěpení restriktivními enzymy
- v délce řetězce DNA ohraničené restriktivními místy
- specifický profil proužků odpovídající určitému druhu MO

• Při štěpení dsDNA vznikají:

- -Tupé konce
- -Kohezní konce (lepivé)

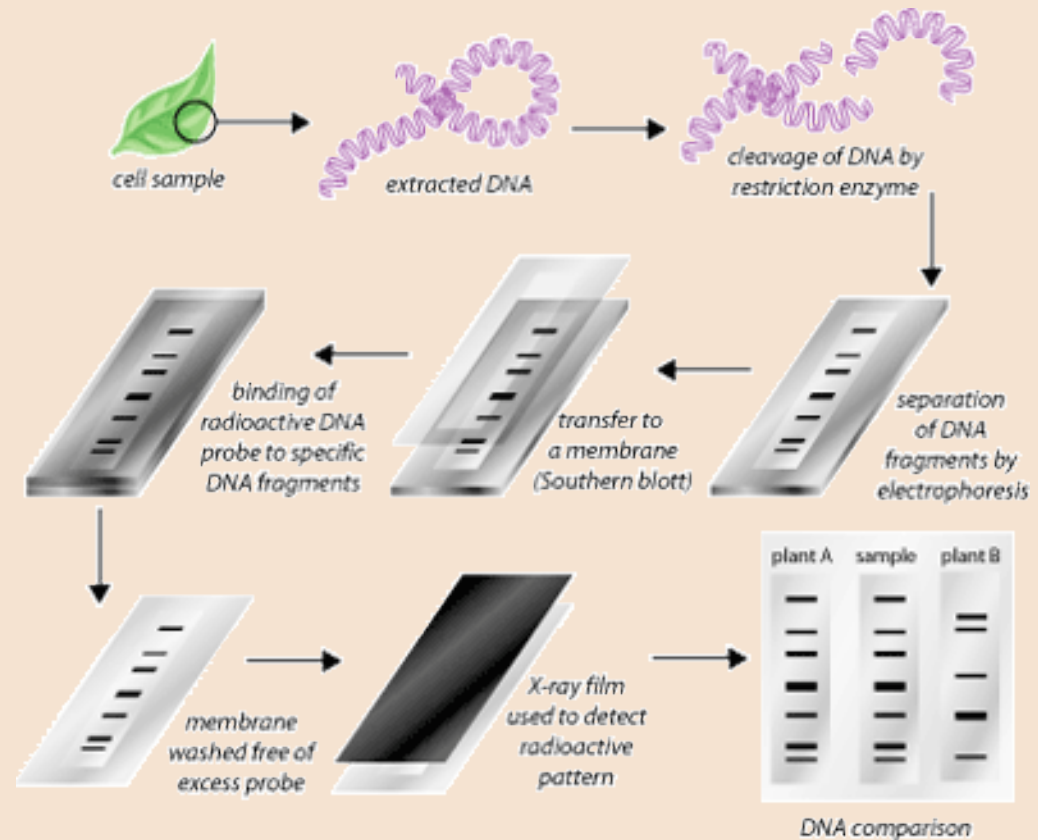
• Díky tomu může vytvořit smyčku, kterou enzym snáze najde a odstříhne. Pokud jedna alela určitého genu obsahuje rozpoznávací sekvenci, zatímco jiná nikoliv, bude DNA první alely rozštěpena, zatímco DNA druhé alely zůstane vcelku. Při elektroforéze fragmentů pak pro rozštěpenou sekvenci nalezneme dva kratší úseky, kdežto nerozštěpená DNA vytvoří v gelu jen jeden proužek odpovídající delší sekvenci o původní délce.



# RFLP

## Polymorfismus délky restričních fragmentů

- vyextrahování DNA ze vzorku je rozštěpení molekuly na jednotlivé malé fragmenty
- restričních endonukleázy - dokáží rozeznat krátké sekvence nukleotidů (4, 6, 8)
- podle rozeznané sekvence dokáží DNA v konkrétním místě rozštěpit
- fragmentace DNA na díly, které jsou specifické pro skupinu MO
- směs různě velikých úseků DNA je možné si dané úseky namnožit pomocí PCR



evropský  
sociální  
fond v ČR



EVROPSKÁ UNIE



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,  
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY

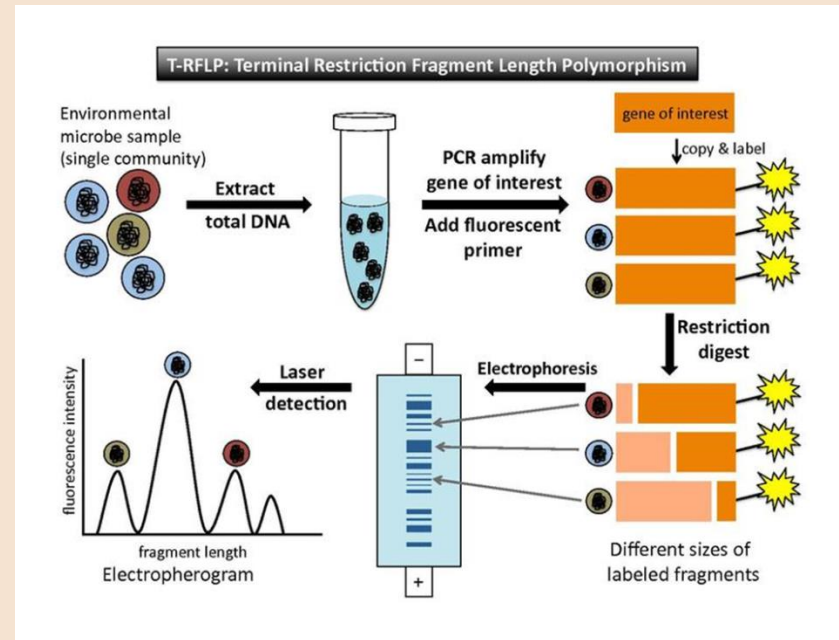


OP Vzdělávání  
pro konkurenceschopnost

INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

# Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism

- Profil mikrobiální komunity na základě pozice restričního místa v 16S rRNA
- PCR - využití fluorescenčního značení primerů na 5' konci
- Založena na štěpení mixu PCR produktů jednoho genu, resp. jeho variant, přítomných ve společenstvu
- pomocí 1 či více restričních enzymů (obv. tetracutter restriktázy)

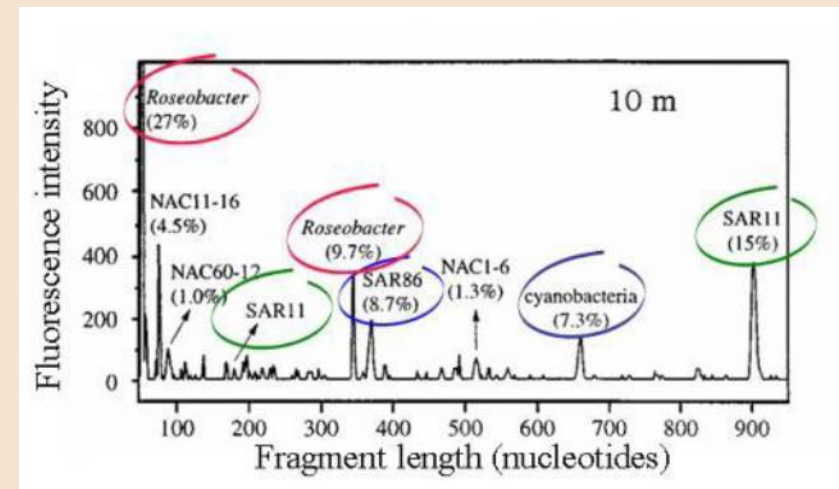
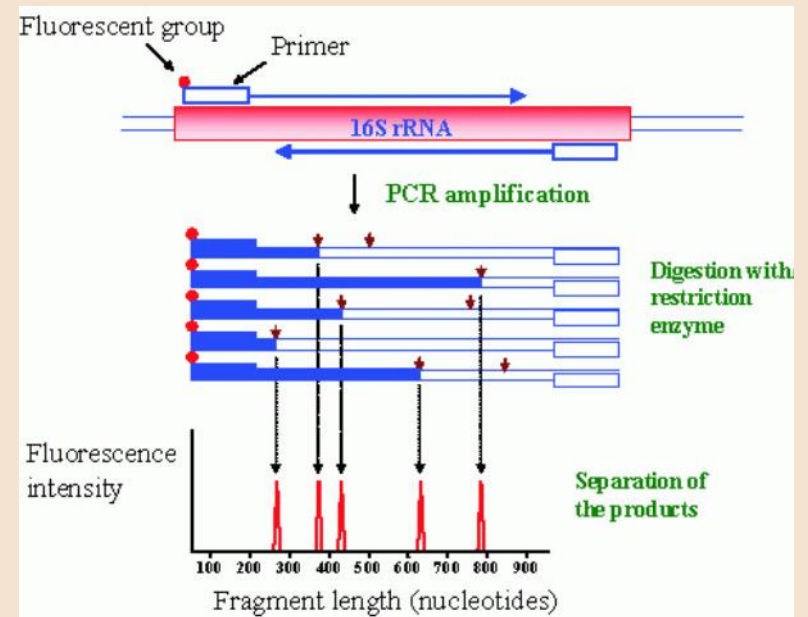


1. DNA izolace a purifikace
2. PCR amplifikace a štěpení enzymy
3. Separace a detekce štěpných produktů na elektroforéze
4. Analýza dat - profil fragmentů pro každý vzorek
5. Klastrová analýza na základě získaných profilů ve vzorku



# T-RFLP

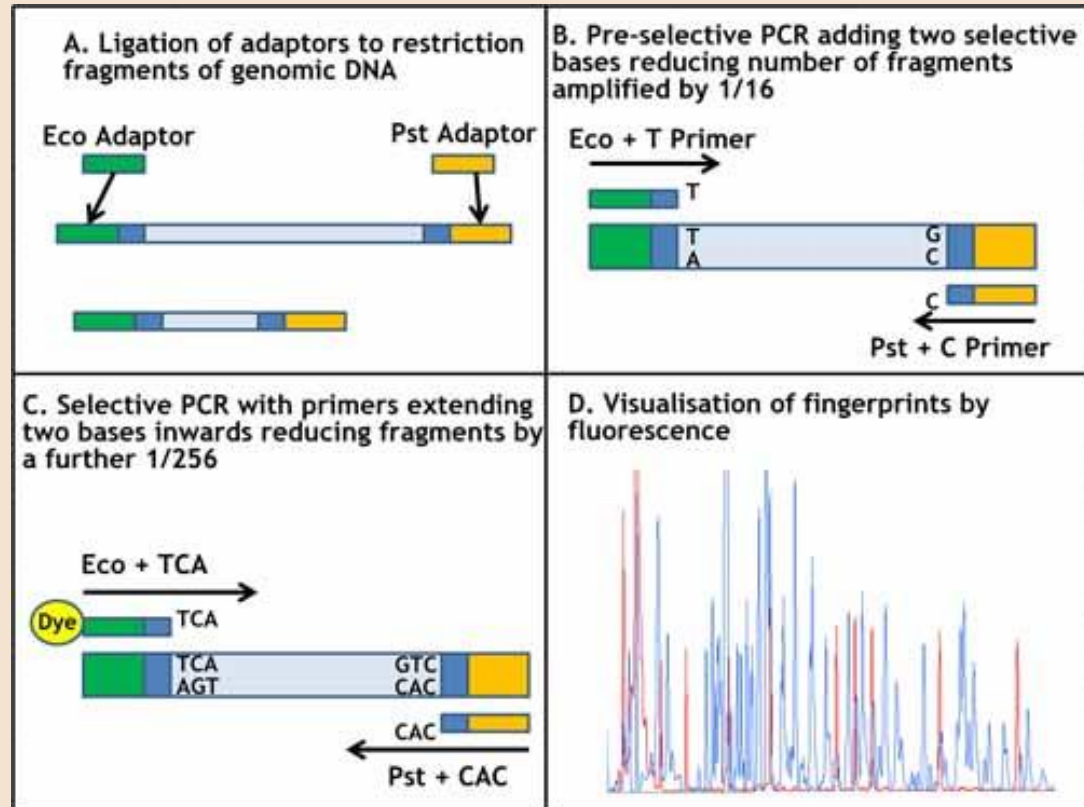
- separace fingerprintu pomocí kapilární nebo polyakrylamidové elektroforózy
- detekce velikosti každého ze získaných **terminálních** fragmentů pomocí DNA sekvenátoru
- výsledek - graf, osa X představuje velikosti fragmentů a osa Y intenzitu jejich fluorescence
- identifikace peaků pomocí klonové knihovny



# AFLP - Amplified fragment length polymorphism

- **AFLP-PCR**
- **Restrikční enzymy rozštěpí genomickou DNA**
- Ligace adaptorů na lepicí konce restrikčních fragmentů
- Amplifikace restrikčních fragmentů - PCR primery komplementární k adaptorům a restrikčním místům, přesah o několik nukleotidů dovnitř
- Separace a vizualizace fragmentů - denaturační polyakrylamid. Gel, autoradiografie, fluorescenční metody, kapilární sekvenace....

- Vysoce citlivá metoda k detekci polymorfismu v DNA, reprezentativnost dat, rozlišení...
- analýza až 100 sekvencí najednou
- AFLP velmi výhodná pro studium taxonů bakterií, hub, rostlin



# AFLP - příklad

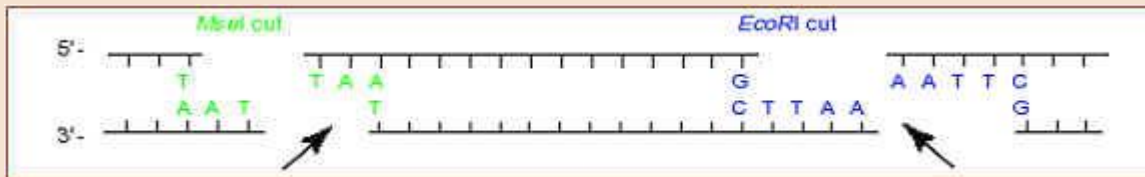
## 1. restrikce

specifické rozštěpení celkové DNA dvěma restrikčními endonukleázami

*MseI* - rozpoznává 4bp dlouhou sekvenci (TTAA)

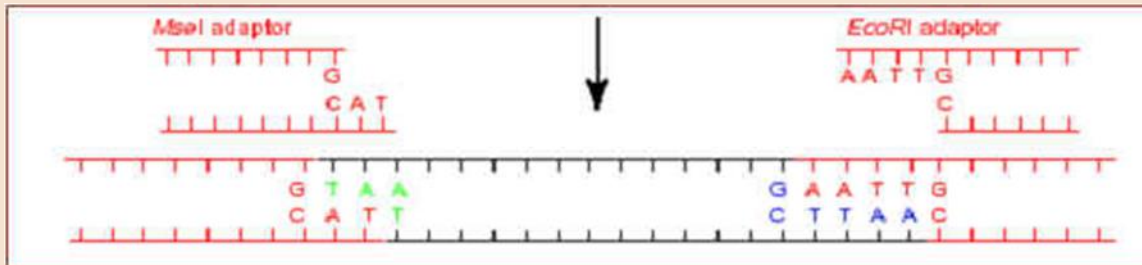
*EcoRI* - rozpoznává 6bp dlouhou sekvenci (GAATTC)

dostaneme velké množství fragmentů, které mají na jednom konci *MseI* a na druhém *EcoRI* štěpné místo



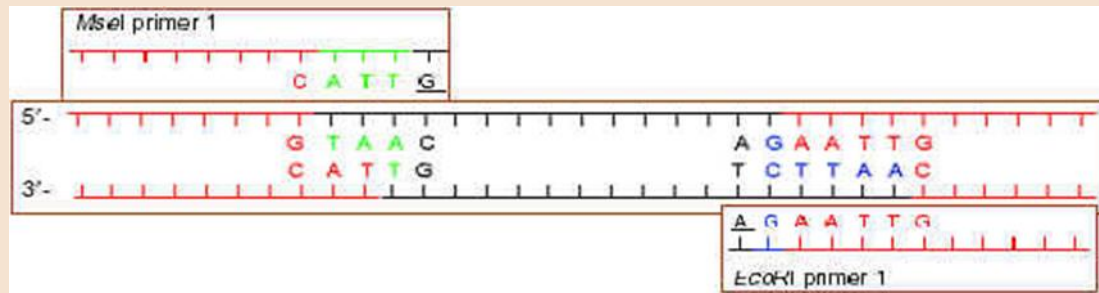
## 2. Ligace adaptorů

pomocí T4 ligázy jsou ke všem fragmentům připojeny adaptory  
nyní tedy známe sekvence začátků a konců všech fragmentů



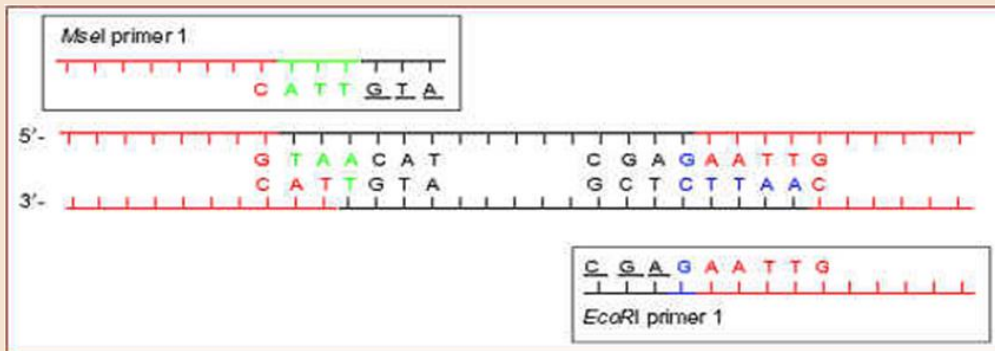
# AFLP

- **3. preselektivní amplifikace**
- protože známe počáteční sekvence počátků všech fragmentů, můžeme je přidáním specifických primerů namnožit pomocí PCR
- velké množství fragmentů je třeba redukovat na počet, který budeme schopni vyhodnotit
- primery jsou komplementární a adaptorům, jsou však o 1 bázi delší a přesahují tak "dovnitř" studovaného fragmentu
- namnoží se tak pouze 1/4 všech fragmentů (pouze ty, co mají na příslušném místě komplementární bázi), tj. protože používáme 2 primery, je amplifikována pouze 1/16 fragmentů (1/4 x 1/4)



## 4. selektivní amplifikace

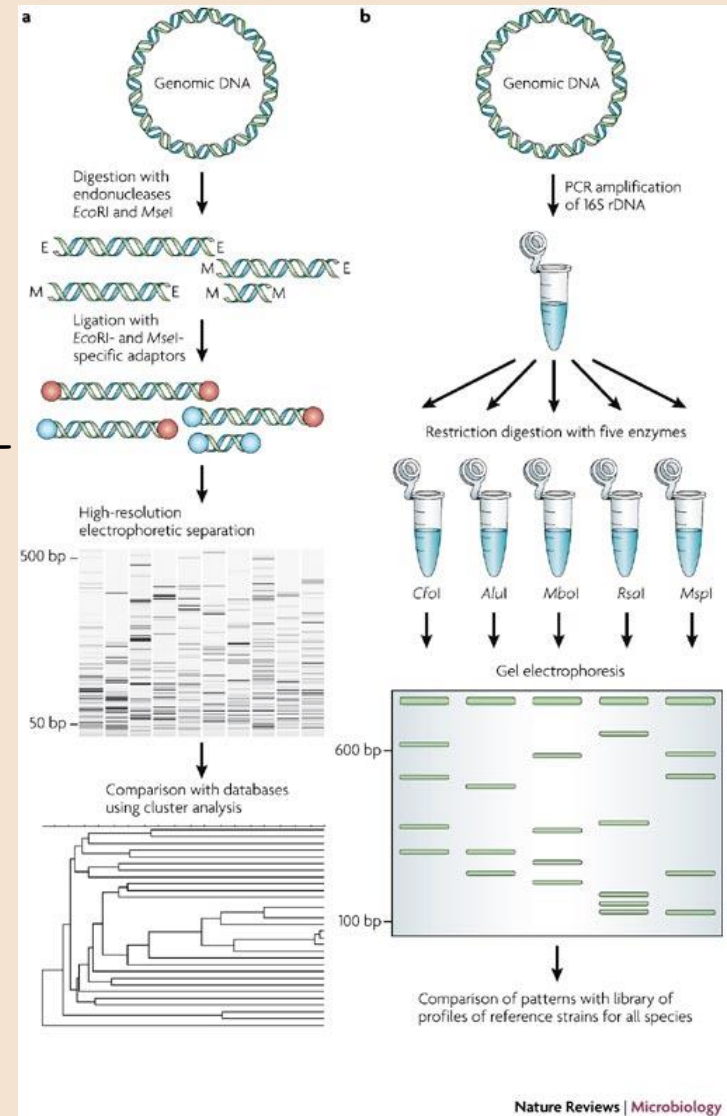
fragmentů je stále ještě příliš mnoho na to, abychom je mohli spolehlivě vyhodnotit, je třeba jejich počet dále zredukovat  
proto použijeme primery se třemi selektivními nukleotidy (přesahy "dovnitř" studovaných fragmentů)  
v tomto případě je amplifikována pouze 1/256 všech fragmentů (1/16 x 1/16)



# ARDRA

## Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis (ARDRA) (Vanechoutte et al., 1993)

- restrikční štěpení amplifikovaného fragmentu DNA pro konzervativní úseky rRNA bakterií
- 16S rRNA gene - 1650 bp
- Pro větší rozlišení DNA fingerprintů bakterií - nutno použít 4-6 různých enzymů a separace na PAGE
- Tetracutter restriktázy - 4 nukleotidová štěpná místa
- frekvence náhodného výskytu 4 bp restrikčního místa je každých 256 bp
- Restriktázy s rozp.místem delším než 4 bp nejsou vhodné vzhledem k celkové délce genu 1500bp (16s rRNA)
- Získaný pattern reprezentativní pro taxonomické analýzy - fylogenetická charakterizace izolátů z kultur 16s genů z environmentálních vzorků
- kladogram, fylogram





# RISA/ARISA

## (Automated) Ribosomal Intergenic Spacer Analysis (A-RISA)

- prokaryotická DNA kodující vysoce konzervativní 16SrRNA a 23SrRNA geny
- mezi těmito dvěma geny se nachází tzv. internal transcribed spacer (ITS) region
- **ITS - nekoduje proteiny, vysoce variabilní v sekvenci a délce nukleotidů**
- DNA je izolována, pomocí PCR amplifikován ITS
- Fragmenty mohou být vizualizovány jako bandy na gelu (RISA)
- Za použití fluorescenčních primerů jako peaky abundance jednotlivých fragmentů elektroferogram (ARISA)

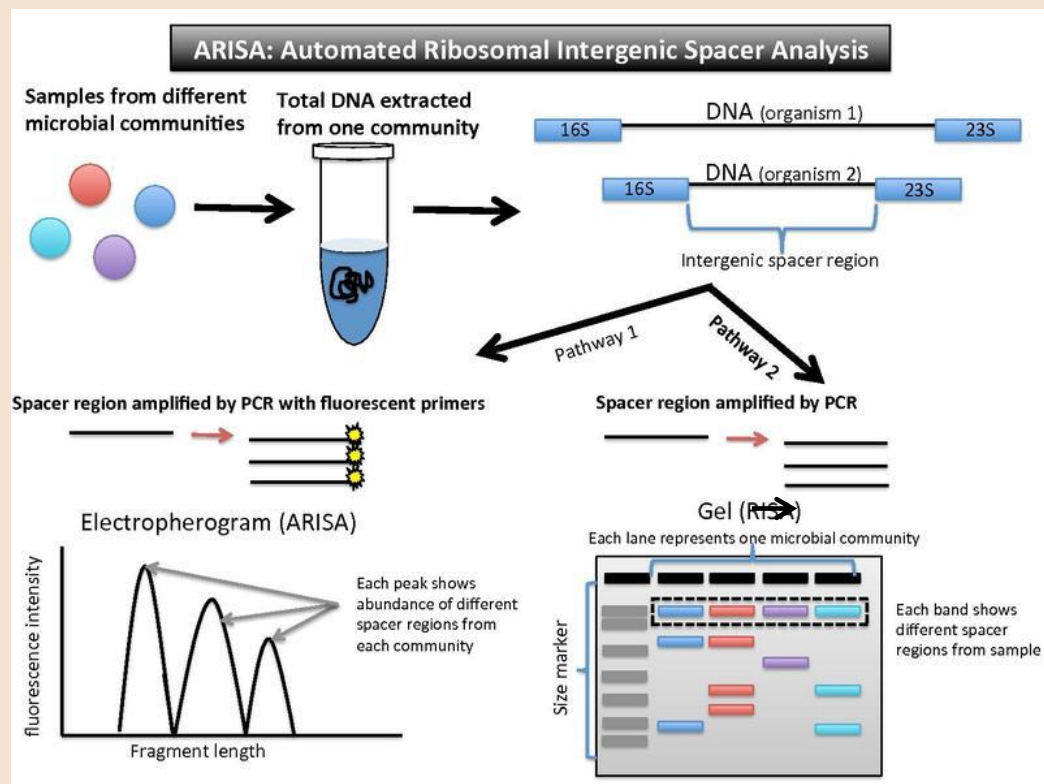
- Profil specifický pro určitou skupinu MO
- Prevalence určitých skupin ve společenstvu

- Vyšší rozlišení detekce mikrobiálních společenstev než T RFLP

- Data lze porovnat s databází pro kultivovatelné organismy

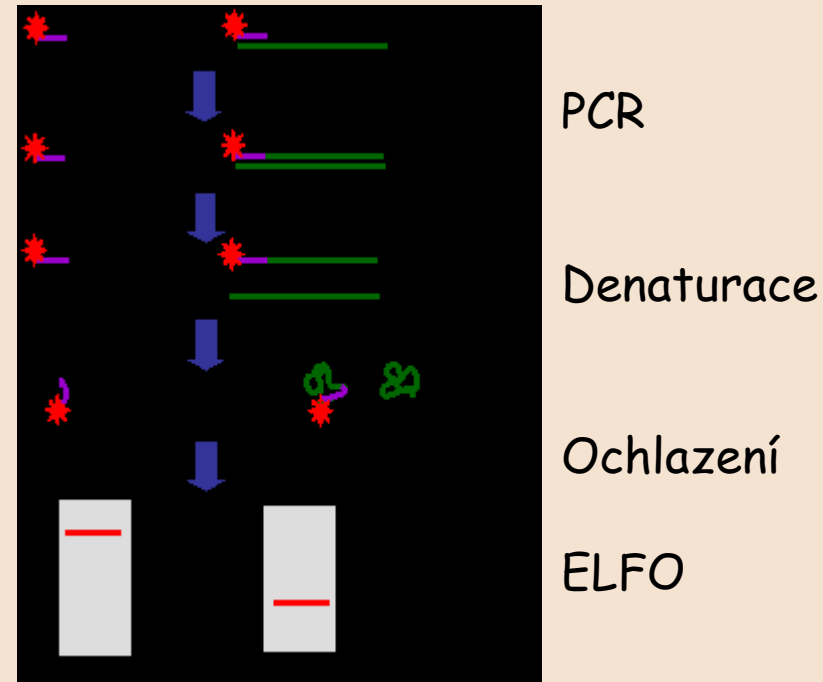
- Nevýhody - i nepříbuzné druhy mohou mít podobně dlouhé ITS podhodnocení diverzity společenstva

- naopak, jeden typ MO může mít více peaků v profilu společenstva



# SSCP (Single-Strand Conformation Polymorphism) ...

- Změny v konformaci (3D) fragmentů ssDNA
- PCR -fluor.značené primery
- denaturace DNA, 2-3 min, 95°C+ formamid
- rychlé ochlazení na ledu
- různé konformační formy DNA
- různá pohyblivost v gelu agarosové elektroforézy

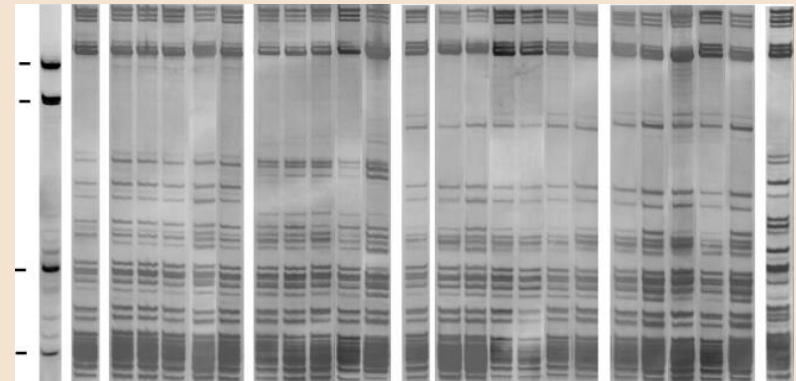


## Reasociace DNA

- Teplotní denaturace , renaturace , sledování míry reasociace (např.  $T_m$ )

## Low molecular weight (LMW) RNA pattern analysis

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



**DĚKUJI ZA POZORNOST**

