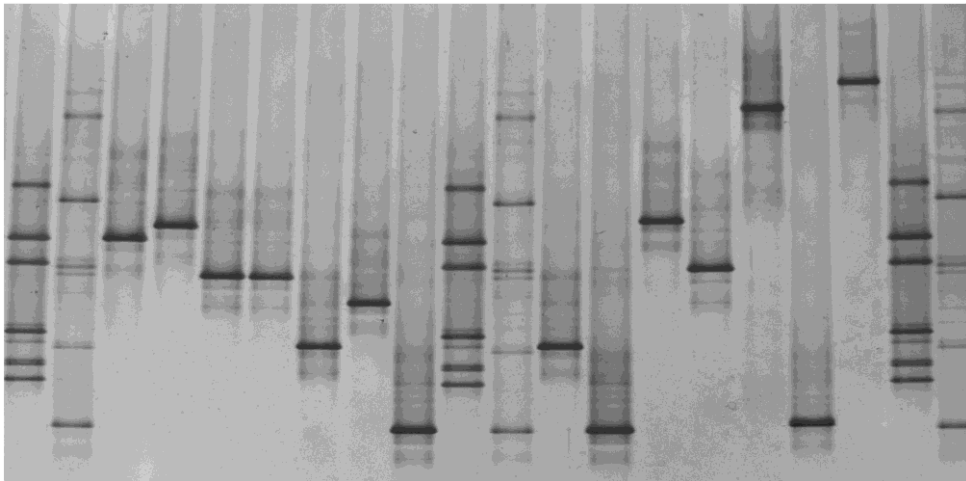


**Εργαστηριακές Ασκήσεις
Περιβαλλοντικής Βιοτεχνολογίας**

Εργαστηριακή Άσκηση 7

**Αξιολόγηση της ποικιλότητας των μικροοργανισμών στο
έδαφος με την χρήση της μεθόδου DGGE**



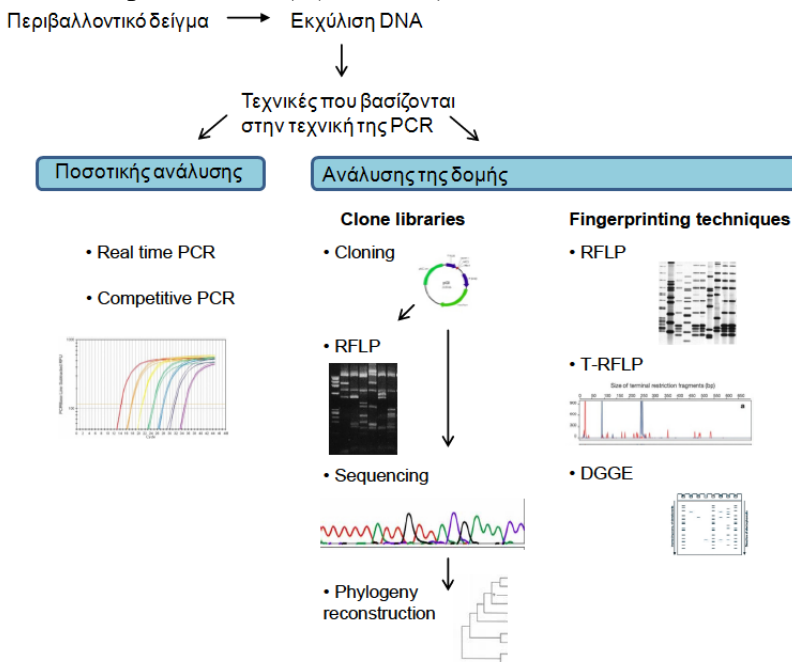
Δημήτριος Καρπούζας

Λάρισα 2010

Τεχνικές Αξιολόγησης της Ποικιλότητας των Μικροοργανισμών

Διάφορες μέθοδοι έχουν χρησιμοποιηθεί για τη μελέτη της ποικιλότητας των μικροοργανισμών του εδάφους. Αυτές μπορούν να ταξινομηθούν σε δύο κύριες κατηγορίες (i) στις μεθόδους που βασίζονται στην καλλιέργεια των μικροοργανισμών σε επιλεγμένα θρεπτικά μέσα και (ii) στις μη εξαρτώμενες από την καλλιέργεια μεθόδους. Στο παρελθόν, οι μέθοδοι ανάλυσης των μικροοργανισμών του εδάφους βασίζονταν στην καλλιέργεια και στην απομόνωση. Μια μεγάλη ποικιλία θρεπτικών μέσων καλλιέργειας έχει αναπτυχθεί για να μεγιστοποιήσει την ανίχνευση ποικίλων μικροβιακών ομάδων. Το σημαντικότερο μειονέκτημα των μεθόδων αυτών ήταν ότι στην πλειοψηφία τους οι μικροοργανισμοί που υπάρχουν σε ένα περιβαλλοντικό δείγμα δεν μπορούν να καλλιεργηθούν στο εργαστήριο. Έχει προταθεί ότι τουλάχιστον το 95-99% των βακτηρίων που παρατηρούνται στο μικροσκόπιο δεν μπορούν να καλλιεργηθούν με συμβατικές μικροβιολογικές μεθόδους (Rappe and Giovannoni). Επίσης, πολλοί μύκητες είναι δύσκολο να καλλιεργηθούν στο εργαστήριο (van Elsas et al., 2000).

Η ανάπτυξη των μοριακών βιολογικών μεθόδων, οι οποίες δεν βασίζονται στην καλλιέργεια μικροοργανισμών, προσφέρει νέες δυνατότητες στην ανάλυση της μικροβιακής ποικιλότητας στο εδάφος. Οι μοριακές αυτές τεχνικές μπορεί να δώσουν πληροφορίες για την δομή (π.χ βιβλιοθήκες κλώνων, T-RFLP, DGGE) ή για την αφθονία των μικροβιακών κοινοτήτων (real-time PCR, competitive PCR) (Εικόνα 1).

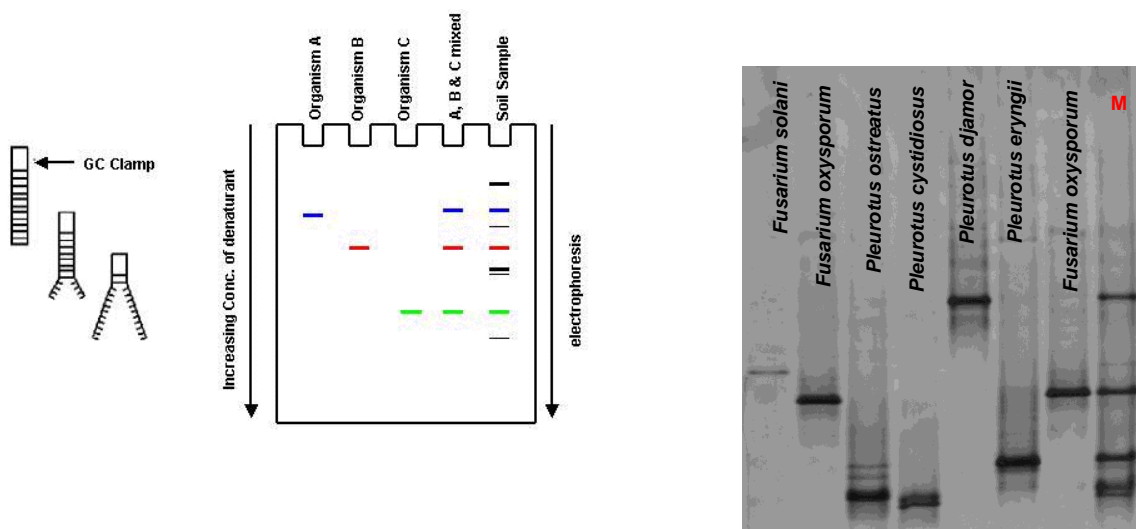


Εικόνα 1. Συχνά χρησιμοποιούμενες μοριακές τεχνικές για την μελέτη της δομής και της πυκνότητας των μικροβιακών κοινοτήτων.

Αρχές μεθόδου DGGE

Μια από τις πρώτες μεθόδους αποτύπωσης DNA που εφαρμόστηκε με επιτυχία στη μικροβιακή οικολογία ήταν η ηλεκτροφόρηση σε πηκτή με βαθμίδωση αποδιατακτικών ουσιών (DGGE, Denaturing Gradient Gel Electrophoresis) (Muyzer, et al., 1993). Η μέθοδος DGGE έχει τη ικανότητα να διαχωρίζει μικρά μόρια DNA (περίπου 200-600 bp) που έχουν το ίδιο μέγεθος, αλλά διαφέρουν τουλάχιστον σε ένα νουκλεοτίδιο, κατά την ηλεκτροφόρηση σε πηκτή με αυξημένη βαθμίδωση αποδιατακτικών ουσιών. Ο διαχωρισμός αυτός βασίζεται στη μειωμένη ηλεκτροφορητική κινητικότητα ενός μερικώς αποδιαταγμένου μορίου DNA σε πηκτή σε σύγκριση με τη κινητικότητα της πλήρως δίκλωνης μορφής του μορίου. Οι δύο αλυσίδες ενός DNA τμήματος αποδιατάσσονται σε συγκεκριμένη θερμοκρασία, η οποία εξαρτάται από (i) τους δεσμούς

υδρογόνου που σχηματίζονται μεταξύ των συμπληρωματικών βάσεων (αλληλουχίες πλούσιες σε GC αποδιατάσσονται σε υψηλότερες θερμοκρασίες) και (ii) από το στοίβαγμα μεταξύ των γειτονικών βάσεων στην ίδια αλυσίδα (base stacking). Κατά τη διάρκεια της ηλεκτροφόρησης σε πηκτή ακρυλαμίδης, η κινητικότητα ενός μορίου επιβραδύνεται όταν μια περιοχή του αποδιαταχθεί. Η ολική αποδιάταξη του μορίου αποτρέπεται από τη παρουσία μιας αλληλουχίας πλούσιας σε GC (GC clamp) στο ένα άκρο του. Αυτό επιτυγχάνεται με τη χρήση ενός PCR εκκινητή που φέρει στο 5' άκρο ένα GC clamp. Το πρότυπο των ζωνών που προκύπτει από την ηλεκτροφόρηση ενός δείγματος αντανακλά άμεσα τη γενετική του ποικιλότητα και ο αριθμός των ζωνών αντιπροσωπεύει τον αριθμό των κυρίαρχων ειδών. Το DGGE χρησιμοποιείται στη μικροβιακή οικολογία για τη μελέτη μεταβολών που συμβαίνουν σε μια μικροβιακή κοινότητα εξαιτίας περιβαλλοντικών αλλαγών ή μετά από εφαρμογή εξωτερικών καταπονήσεων και ρύπανσης, χρονο-εξαρτώμενων μεταβολών στην ριζόσφαιρα φυτών ή μεταβολών κατά την διάρκεια εφαρμογής βιολογικής απορρύπανσης (Muyzer and Smalla, 1998).



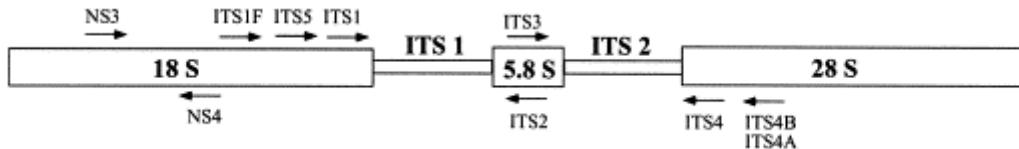
Εικόνα 2. Σχηματική αναπαράσταση της αρχής στην οποία βασίζεται η μέθοδος μοριακής αποτύπωσης DGGE (a) και πηκτή DGGE όπου παρουσιάζεται το μοριακό αποτύπωμα έξι μυκήτων που ανήκουν στα γένη *Fusarium* και *Pleurotus* καθώς και το αποτύπωμα μίγματος τους (M).

Βήματα για την αποτύπωση της ποικιλότητας των μικροοργανισμών με την μέθοδο DGGE

1. Εξαγωγή DNA/RNA από περιβαλλοντικά δείγματα όπως έδαφος: Το πρώτο βήμα για τον χαρακτηρισμό της μικροβιακής κοινότητας του εδάφους με μοριακές μεθόδους είναι η εξαγωγή του DNA από το έδαφος. Δύο μέθοδοι έχουν αναπτυχθεί για την απομόνωση του DNA: **(i) η μέθοδος άμεσης λύσης** και **(ii) η μέθοδος απομόνωσης κυττάρων** (Griffiths et al. 2000, Martin Laurent et al., 2001). Η πρώτη μέθοδος βασίζεται στην άμεση λύση των κυττάρων στο έδαφος η οποία μπορεί να γίνει με μηχανικό ή χημικό ή ενζυμικό τρόπο ή και με συνδυασμό τους. Μετά τη λύση το DNA εκχυλίζεται και καθαρίζεται. Ενώ στη δεύτερη μέθοδο πριν τη λύση των κυττάρων και την ανάκτηση του DNA γίνεται διαχωρισμός των κυττάρων από τα σωματίδια του εδάφους. Για την περαιτέρω ανάλυση του εκχυλισμένου DNA με μοριακές τεχνικές όπως είναι η PCR είναι απαραίτητο το DNA να είναι ελεύθερο προσμίξεων όπως πολυφαινολικά, χουμικά οξέα ή πολυσακχαρίδια και πρωτεΐνες. Η παρουσία ουσιών τέτοιων ουσιών στο εκχυλισμένο DNA του εδάφους μπορούν να προκαλέσουν αναστολή της δράσης της πολυμεράσης κατά την PCR. Και για τις δύο μεθόδους ένας μεγάλος αριθμός πρωτοκόλλων έχει δημοσιευτεί με διάφορες τροποποιήσεις που αποσκοπούν στη βελτίωση της ποιότητας και της ποσότητας του DNA που εκχυλίζεται. Επίσης διάφορα εμπορικά kit είναι διαθέσιμα για την εκχύλιση DNA από το έδαφος. Από μελέτες σύγκρισης των δύο μεθόδων έχει βρεθεί ότι με την μέθοδο της άμεσης λύσης εξάγεται μεγαλύτερη ποσότητα DNA ενώ με τη μέθοδο απομόνωσης κυττάρων εκχυλίζεται DNA μεγαλύτερου μοριακού βάρους και υψηλότερης καθαρότητας. Επίσης το DNA

που εξάγεται από απομονωμένα κύτταρα προέρχεται κυρίως από βακτήρια ενώ με την μέθοδο άμεσης λύσης εξάγεται βακτηριακό και ευκαρυωτικό DNA

2. Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (PCR): Η τεχνική της PCR (Polymerase Chain Reaction) επιτρέπει τον ενζυμικό πολλαπλασιασμό *in vitro* επιλεγμένων αλληλουχιών DNA από ελάχιστες αρχικές ποσότητες δείγματος. Στόχοι ενίσχυσης αποτελούν ριβοσωμικές περιοχές του γονιδιώματος βακτηρίων και μυκήτων όπως η μικρή ριβοσωμική υπομονάδα 16S και 18S αντίστοιχα, καθώς και η ITS περιοχή για τους μύκητες που παρουσιάζει και χαμηλότερη συντήρηση σε σχέση με την 18S περιοχή και αυτό την καθιστά πιο χρήσιμη στην άντληση φυλογενετικών πληροφοριών σε επίπεδο είδους.



Εικόνα 1. Σχηματική αναπαράσταση του rDNA των μυκήτων και των θέσεων υβριδισμού ορισμένων εκκινήτων

Το 16s rRNA γονίδιο που χρησιμοποιείται για την ταξινόμηση των βακτηρίων περιλαμβάνει συντηρημένες και μεταβλητές περιοχές που εναλλάσσονται μεταξύ τους (Εικόνα 4). Οι συντηρημένες περιοχές χρησιμοποιούνται για την κατασκευή εκκινήτων μορίων με το προϊόν ενίσχυσης να περιλαμβάνει τις μεταβλητές περιοχές που περιέχουν τις πληροφορίες για τον φυλογενετικό χαρακτηρισμό των βακτηρίων.



CONSERVED REGIONS: unspecific applications

VARIABLE REGIONS: group or species-specific applications

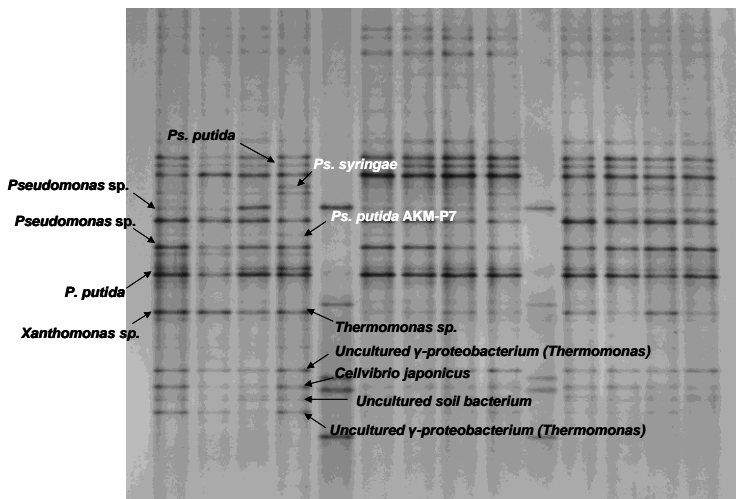
Εικόνα 4. Η αλληλουχία του 16S RRNA γονίδιο αποτελείται από συντηρημένες και μεταβλητές περιοχές (V περιοχές)

Σήμερα είναι δυνατόν με την επιλογή ή κατασκευή εξειδικευμένων εκκινήτων μορίων να μελετηθούν αποκλειστικά συγκεκριμένες ταξινομικά διαφοροποιημένες ομάδες ή γένη βακτηρίων όπως α-πρωτεοβακτήρια, ακτινοβακτήρια, *Sphingomonas* κτλ (Πίνακας 2). Ανάλογη επιλογή για τους μύκητες μας δίνει την δυνατότητα μελέτης μόνο βασιδιομυκήτων, ασκομυκήτων ή δενδροειδών μυκορριζικών μυκήτων.

Πίνακας 2. Λίστα με εκκινήτες που μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την μελέτη συγκεκριμένων ομάδων βακτηρίων ή μυκήτων

Εκκινήτες	Ομάδα μικροοργανισμών
CTO189f ABC – CTO654r	Νιτρωδοποιητικά βακτήρια
F243 – 513r	Ακτινοβακτήρια
Sphingo108f – Sphingo420r	<i>Sphingomonas</i>
ITS1F - ITS4B	Βασιδιομύκητες

3. Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή με βαθμίδωση αποδιατακτικών ουσιών -DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis): Το DGGE χρησιμοποιείται για το διαχωρισμό δίκλωνων τμημάτων DNA που έχουν το ίδιο μέγεθος αλλά διαφορετική αλληλουχία βάσεων. Ο διαχωρισμός βασίζεται στη μειωμένη ηλεκτροφορητική κινητικότητα ενός μερικώς αποδιαταγμένου μορίου DNA σε πηκτή πολυακρυλαμίδης σε σύγκριση με τη κινητικότητα της πλήρως δίκλωνης μορφής του μορίου. Όταν ένα μόριο DNA ηλεκτροφορείται σε πηκτή με αυξημένη βαθμίδωση αποδιατακτικών ουσιών, φτάνει σε ένα σημείο όπου αρχίζει μερικώς να αποδιατάσσεται με αποτέλεσμα να επιβραδύνεται η κίνηση του και τελικά σταματάει να κινείται. Το σημείο στο οποίο ένα μόριο DNA αποδιατάσσεται και χάνει την ηλεκτροφορητική κινητικότητά του εξαρτάται από τη νουκλεοτιδική αλληλουχία του μορίου. Διαφορετικές αλληλουχίες DNA αποδιατάσσονται σε διαφορετικές συγκεντρώσεις αποδιατακτικών ουσιών και σταματάνε σε διαφορετικά σημεία στην πηκτή και έτσι διαχωρίζονται. Γενικότερα, τμήματα DNA που παρουσιάζουν στην αλληλουχία τους υψηλό ποσοστό GC αποδιατάσσονται σε υψηλές συγκεντρώσεις ουρίας-φορμαμίδης. Το DGGE μπορεί να διαχωρίσει τμήματα DNA που διαφέρουν ακόμα και σε μία βάση.
4. Ταυτοποίηση ζωνών: Η άντληση φυλογενετικών πληροφοριών από πηκτές DGGE είναι δυνατή με την αποκοπή, καθαρισμός και αλληλούχιση της ζώνης που ενδιαφέρει. Υπάρχουν δύο βασικά προβλήματα με αυτή την τεχνική: 1) Μικρό τμήμα (<300 bp) που δίνει περιορισμένες φυλογενετικές πληροφορίες για την ταυτότητα του μικροοργανισμού 1) Χρονοβόρα και επίπονη διαδικασία καθαρισμού και επιβεβαίωσης της ζώνης.



Εικόνα 5. Ταυτοποίηση ζωνών σε πηκτή DGGE που αποτυπώνει την κοινότητα βακτηρίων του γένους *Pseudomonas* σε δείγματα ριζόσφαιρας φυτών τομάτας.

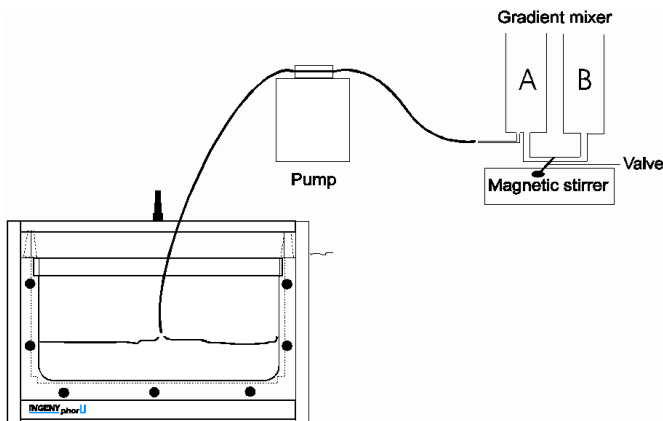
Υλικά

- Πλήρες σύστημα DGGE (INGENYphorU-2x2)
- Αντλία ανάμειξης διαλυμάτων αποδιατακτικών ουσιών
- Γράσο σιλικόνης
- Ακρυλαμίδη (Acrylamide-Bisacrylamide 40% solution 37.5:1)

- Φορμαμίδη (Deinized formamide)
- Ουρία
- TEMED (N,N,N',N' – tetramethylenediamine)
- 10% Ammonium Persulphate Solution (APS, 100mg σε 1ml ddH₂O)
- 50x TAE
- Διαλύματα 0% και 100% αποδιατακτικών ουσιών
- PCR προϊόντα από οκτώ βακτήρια καθώς και το μίγμα τους
- Αυτόματη πιπέτα 2-20 μl και ανάλογα tips

Διαδικασία

1. Προετοιμασία των πλακών ηλεκτροφόρησης, αφού έχει τοποθετηθεί γράσο στις συνάψεις για αποφυγή διαρροών κατά την προετοιμασία της πηκτής, και τοποθέτηση στο σύστημα INGENY
2. Παρασκευή της πηκτής πολυακρυλαμίδης με ανάμιξη διαλυμάτων αποδιατακτικών ουσιών στο εύρος της βαθμίδωσης που επιθυμούμε (πχ. 45-65%) και αφού έχουν προστεθεί ουσίες που προκαλούν τον πολυμερισμό της ακρυλαμίδης όπως TEMED και APS.

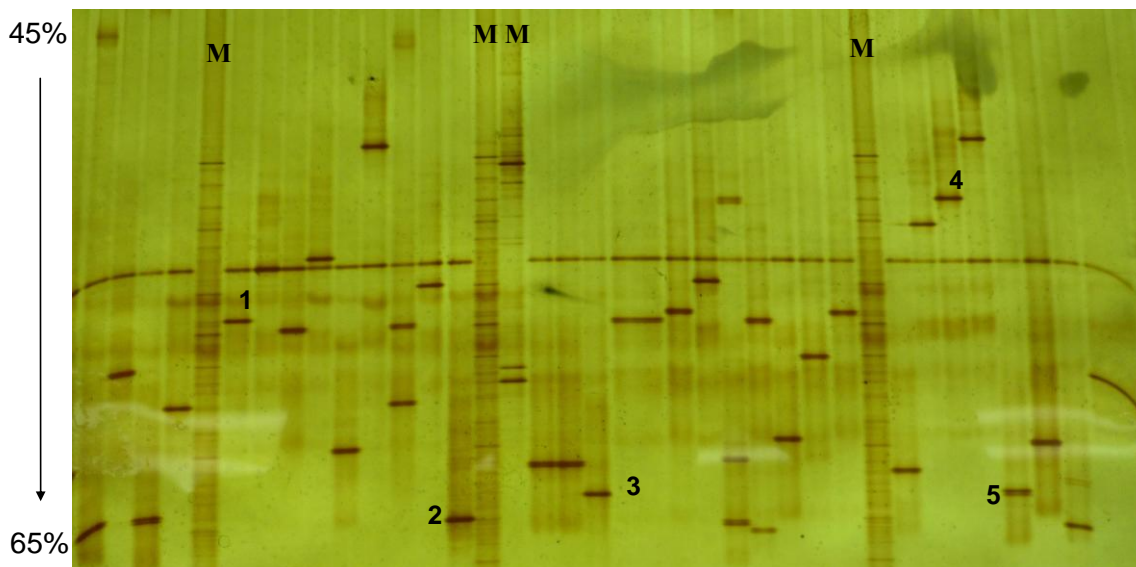


Εικόνα 6. Σχηματική αναπαράσταση του συστήματος παρασκευής της πηκτής DGGE. Το σύστημα περιλαμβάνει σύστημα ανάμιξης των διαλυμάτων αποδιατακτικών ουσιών (Gradient mixer), περισταλτική αντλία (pump) και το σύστημα προετοιμασίας της πηκτής όπου καταλήγει το διάλυμα ακρυλαμίδης.

3. Πολυμερισμός της ακρυλαμίδης και τοποθέτηση της πηκτής στην δεξαμενή του συστήματος ηλεκτροφόρησης που περιέχει TAE 1X σε θερμοκρασία 60°C
4. Φόρτωση των δειγμάτων στα κελιά που έχουν σχηματιστεί (1 μl προϊόν PCR + 5 μl loading buffer)
5. Ηλεκτροφόρηση για διάστημα 16 ωρών στα 75 V
6. Απομάκρυνση των πηκτών και βαφή με την μέθοδο του νιτρικού αργύρου
7. Οπτικοποίηση σε τράπεζα φωτός και ανάλυση των αποτελεσμάτων.

Ερωτήσεις

Παρακάτω παρουσιάζεται DGGE ανάλυση μιας βιβλιοθήκης κλώνων από την βακτηριακή κοινότητα εδάφους. Κάθε γραμμή περιλαμβάνει ένα βακτηριακό κλώνο που περιέχει ένθεμα από την V3 περιοχή του 16s rRNA γονιδίου. Οι γραμμές που έχουν σημειωθεί με M περιλαμβάνουν τα αποτυπώματα της βακτηριακής κοινότητας από περιβαλλοντικά δείγματα.



1. Μπορείτε να κατατάξετε σε γενικότερες ομάδες τα βακτήρια που αντιστοιχούν στις ζώνες 1, 2, 3, 4 και 5 με βάση την κινητικότητα στην πηκτή DGGE;
2. Γιατί σε κάθε γραμμή εμφανίζονται δύο ζώνες; Το περιμένετε;

Σχετική Βιβλιογραφία

- Griffiths RI, Whiteley AS, O'Donnell AG, Bailey MJ (2000) Rapid method for the coextraction of DNA and RNA from natural environments for analysis of ribosomal DNA and rRNA-based microbial community composition. *Applied and Environmental Microbiology* 66: 5488-5491.
- Martin-Laurent F, Phillipot L, Hallet S, Ghaussod R, Germon JC, Soulas G, Catroux G, (2001). DNA extractions from soils: old bias from new microbial analysis methods. *Applied and Environmental Microbiology* 67: 2354-2359.
- Muyzer G, de Waal C, Uitterlinden AG (1993) Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes encoding for 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology* 59, 695-700
- Rappe MS, Giovannoni SJ (2003) The uncultured microbial majority. *Annual Review of Microbiology* 57: 369-394.
- van Elsas, J.D., Frois-Duarte, G., Keijzer-Wolters, A., Smit, E., (2000). Analysis of the dynamics of fungal communities in soil via fungal-specific PCR of soil DNA followed by denaturing gradient gel electrophoresis. *Journal of Microbiological Methods* 43, 133–151.
- Muyzer G, Smalla K. (1998) Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology. *Antonie van Leeuwenhoek* 73: 127–141.