

**Μέθοδοι Μοριακής Βιολογίας
με Εφαρμογή στη
Βακτηριολογία**

Γενετική Βακτηρίων

- *Κατανόηση μηχανισμών λειτουργίας ευκαρυωτικών κυττάρων*
- *Ταξινόμηση βακτηρίων*
- *Διάγνωση λοιμωδών νοσημάτων*
- *Επιδημιολογική μελέτη λοιμώξεων*

Μέθοδοι Μοριακής Βιολογίας που έχουν εφαρμοσθεί στη Βακτηριολογία

- *Ανάλυση πλασμιδιακού DNA*
- *Ανάλυση αλληλουχίας rRNA και DNA*
- *Υβριδισμός με ειδικούς DNA-ανιχνευτές*
- *Ηλεκτροφόρηση χρωμοσωμικού DNA μετά από επίδραση περιοριστικών ενζύμων σε συνεχές και παλλόμενο ηλεκτρικό πεδίο (PFGE)*
- *Αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (PCR)*

Σκοπός

- *Ταχεία διάγνωση λοιμωδών νοσημάτων*
- *Ταυτοποίηση νέων μικροοργανισμών*
- *Ταξινόμηση μικροοργανισμών*
- *Κατανόηση παθογόνου δράσης*
- *Ταυτοποίηση βακτηριακών κλώνων*

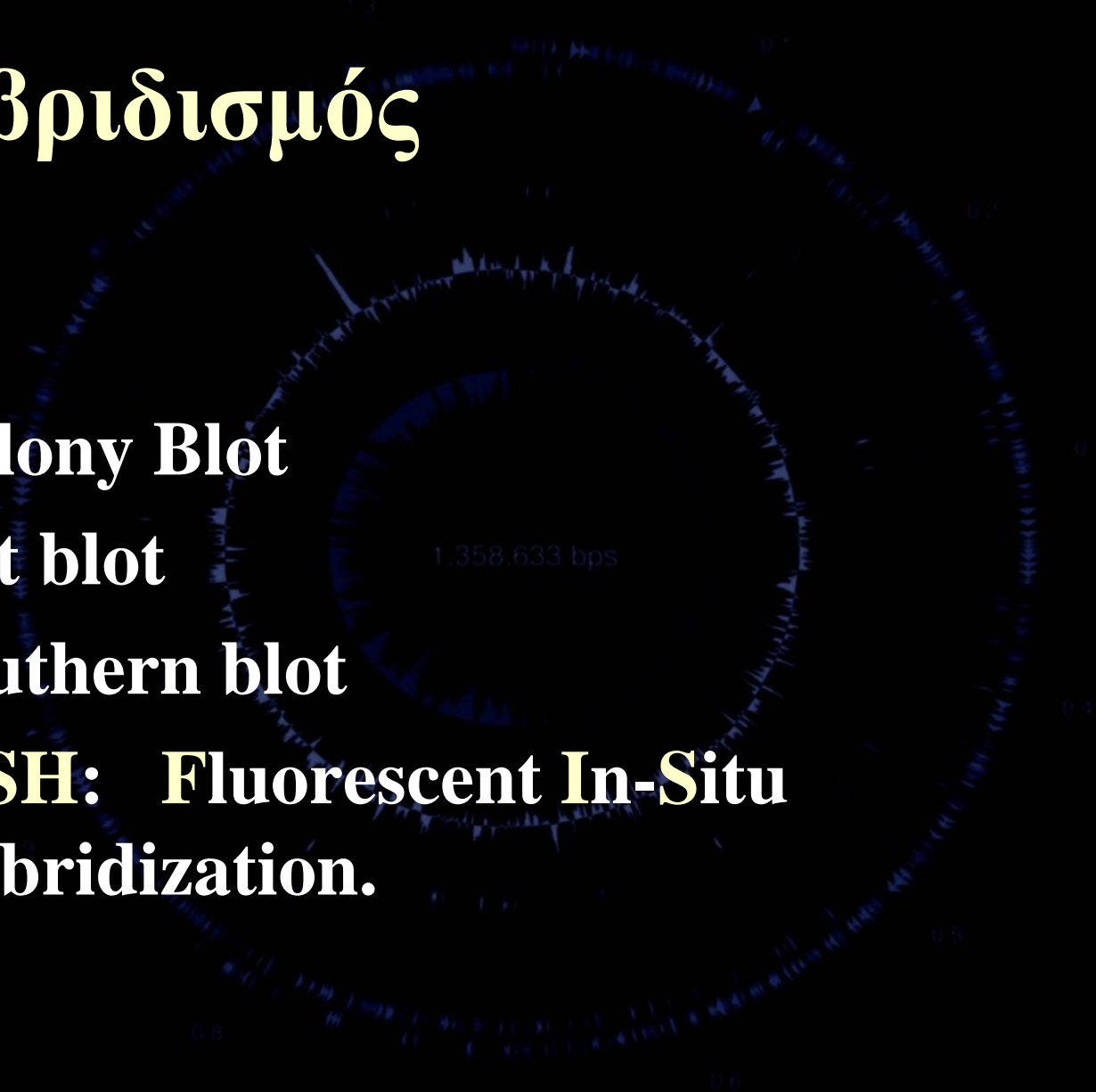
➤ Υβριδισμός

➤ **Colony Blot**

➤ **Dot blot**

➤ **Southern blot**

➤ **FISH: Fluorescent In-Situ Hybridization.**

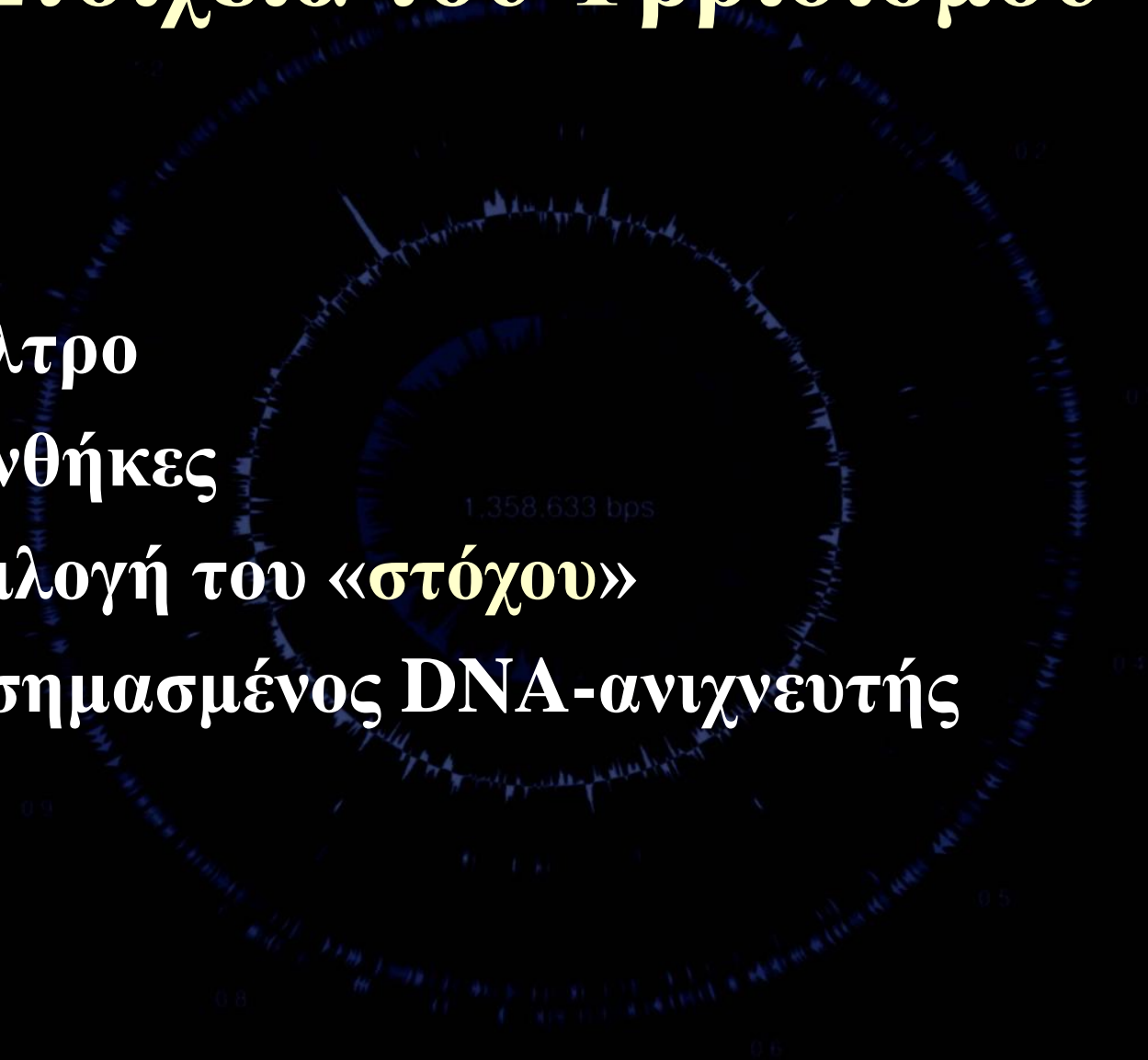


Εφαρμογή

- ο Ανίχνευση
- ο Ταυτοποίηση
- ο Τυποποίηση παθογόνων που αναπτύσσονται δύσκολα ή καθόλου σε τεχνητά θρεπτικά υλικά

Στοιχεία του Υβριδισμού

- Φίλτρο
- Συνθήκες
- Επιλογή του «στόχου»
- Σεσημασμένος DNA-ανιχνευτής



DNA-ανιχνευτής

— σεσημασμένο τμήμα DNA ή RNA που συνδέεται με υψηλή ειδικότητα σε συμπληρωματικές βάσεις του νουκλεϊνικού οξέος-στόχου.

Επιλογή του DNA-στόχου

- ✓ Ο αριθμός των αντιγράφων του στο κύτταρο
- ✓ Η γενετική σταθερότητα της αλληλουχίας
- ✓ Το μέγεθος του στόχου

Μπορεί να είναι

- Τμήμα rDNA γονιδίων
- Πλασμίδιο
- Τρανσποζόνιο
- Γονίδιο παραγωγής τοξίνης
- Γονίδιο αντοχής σε αντιβιοτικά

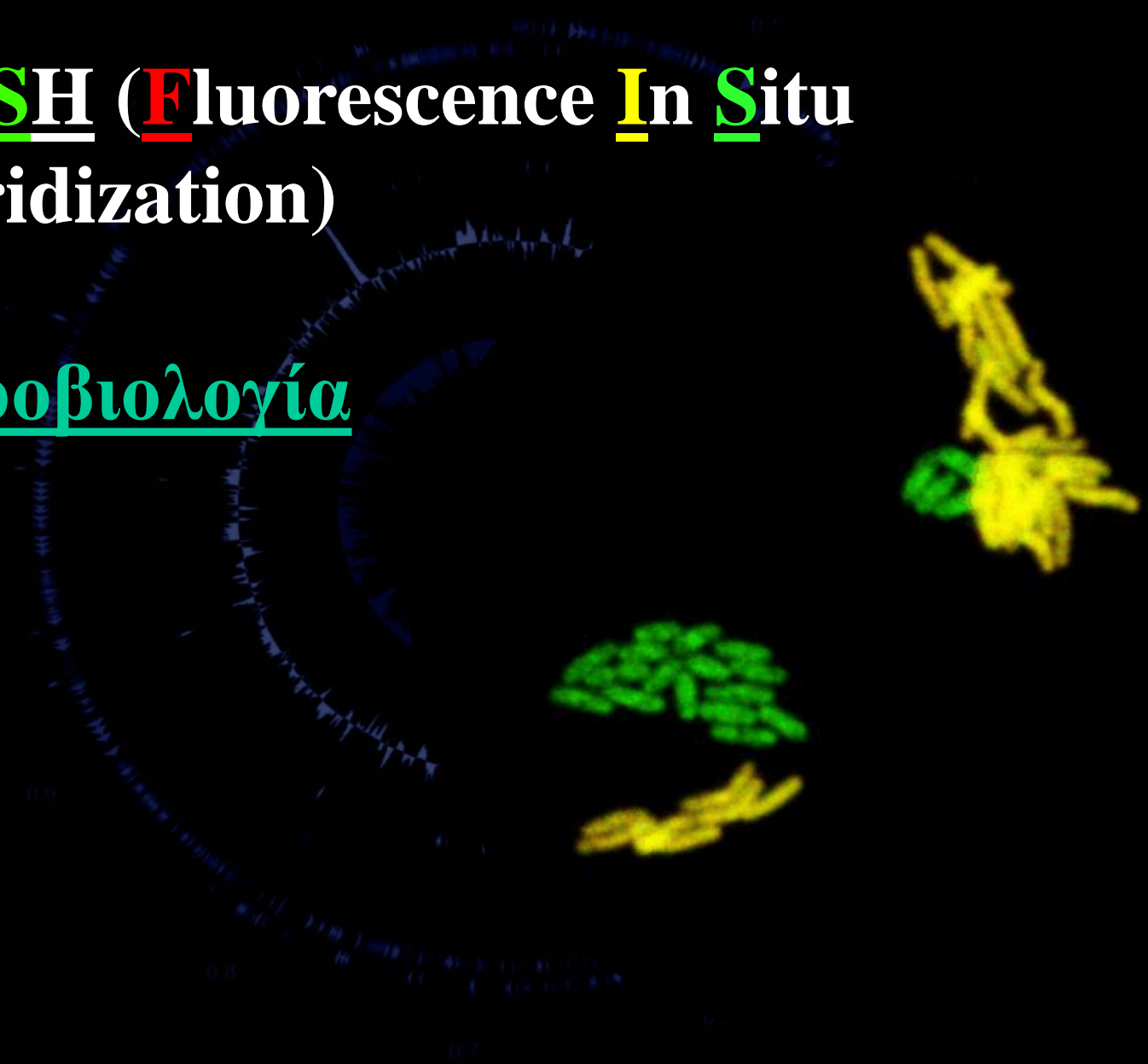
Σήμανση

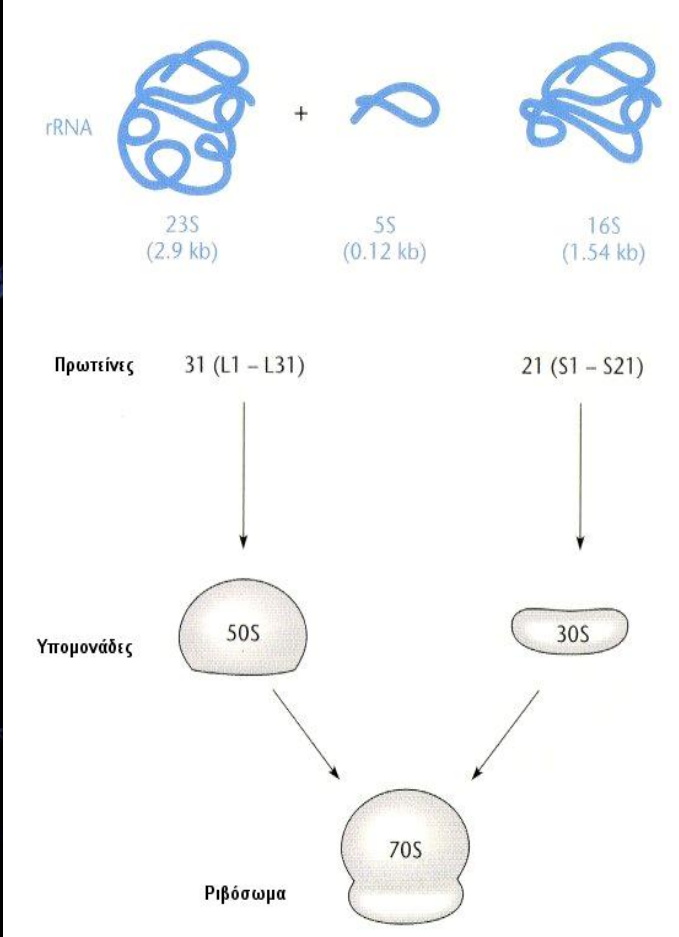
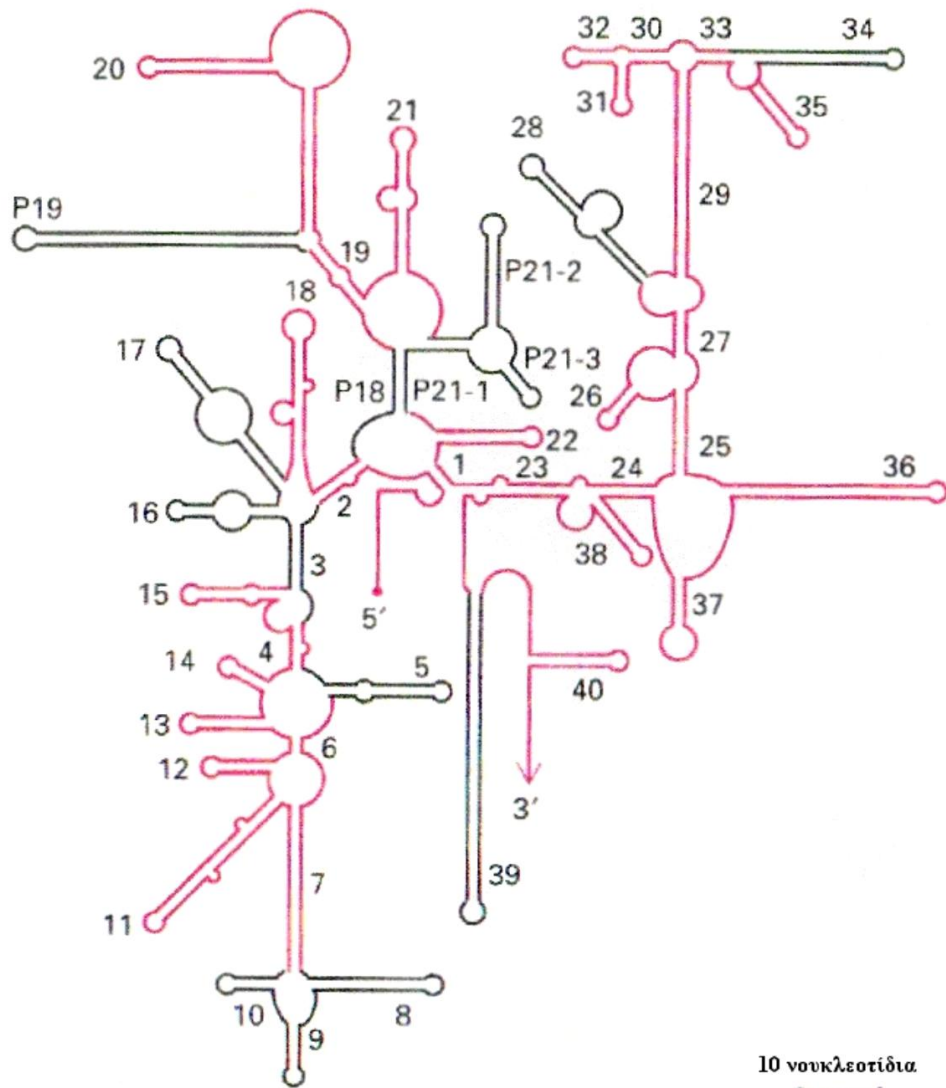
- Ραδιενεργός: ^{32}P , ^{35}S , ^3H , ^{125}I .
- Μη ραδιενεργός:
 - Χημειοφωταύγεια.
 - Χρωματομετρική.
 - Φθορίζουσα.

H FISH (Fluorescence In Situ Hybridization)

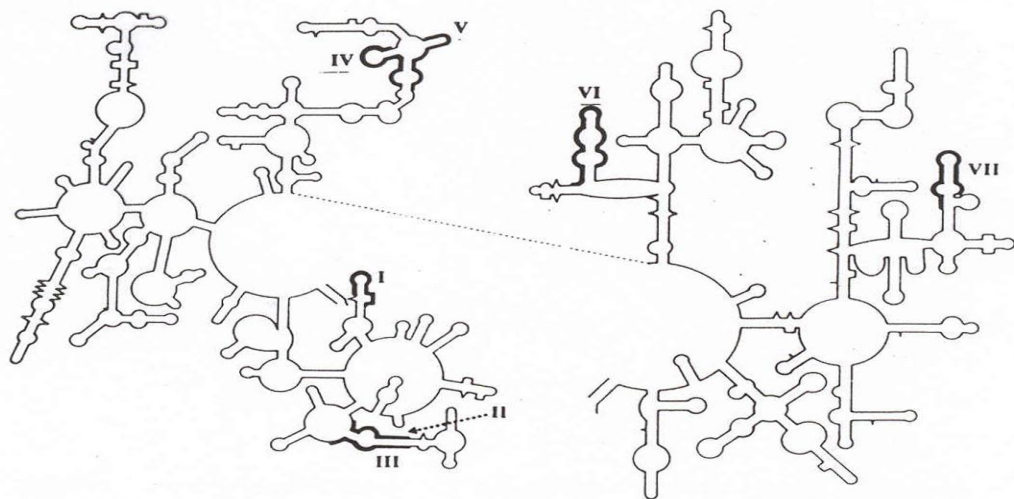
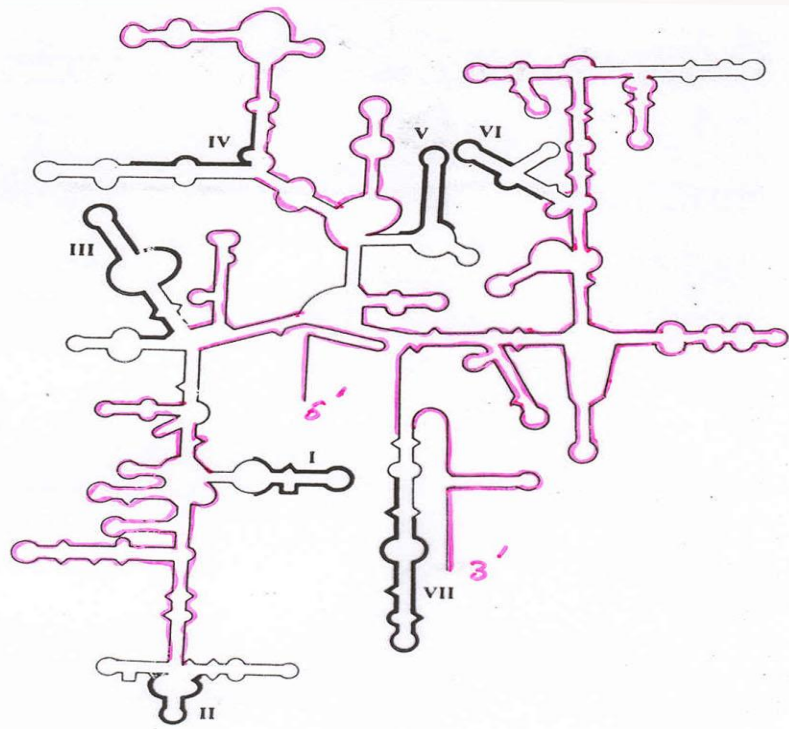
στη

Μικροβιολογία





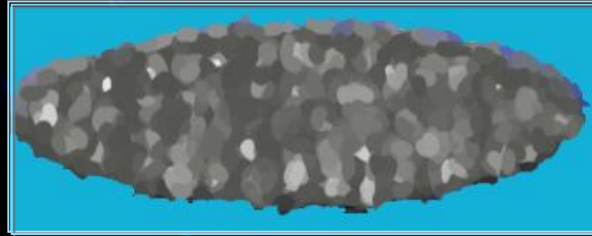
rRNA



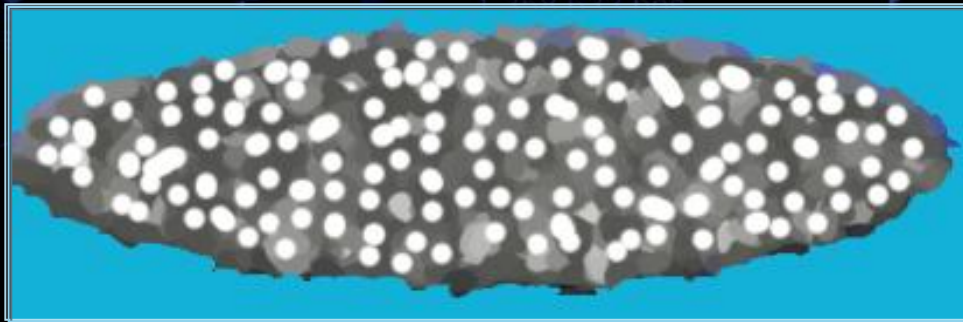
Μεθοδολογία μελέτης

- Σε κάθε βακτήριο ανευρίσκονται 5-8 αντίγραφα των γονιδίων *rDNA*
- Το *rDNA* είναι πολύ καλός στόχος υβριδισμού
- Το *16S rDNA* περιλαμβάνει σταθερές αλληλουχίες και υπερμεταβλητές περιοχές
- Ανάλυση της αλληλουχίας των νουκλεοτιδίων του *rDNA* προτύπου στελέχους

FISH – Διαδικασία seaFAST®



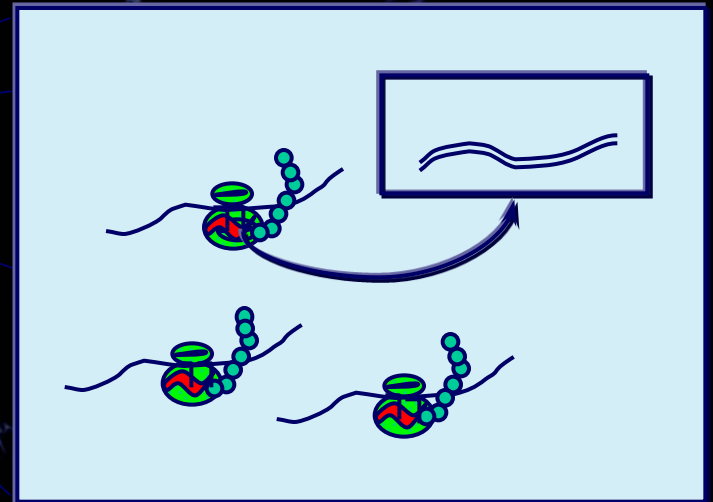
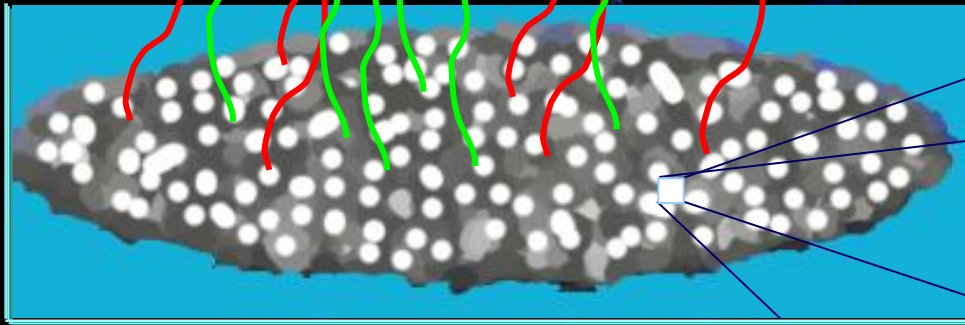
Διάτρηση του κυτταρικού τοιχώματος



**Τα ριβοσώματα παραμένουν
«εγκλωβισμένα» στο
κυτταρόπλασμα.**

FISH - Διαδικασία seaFAST®

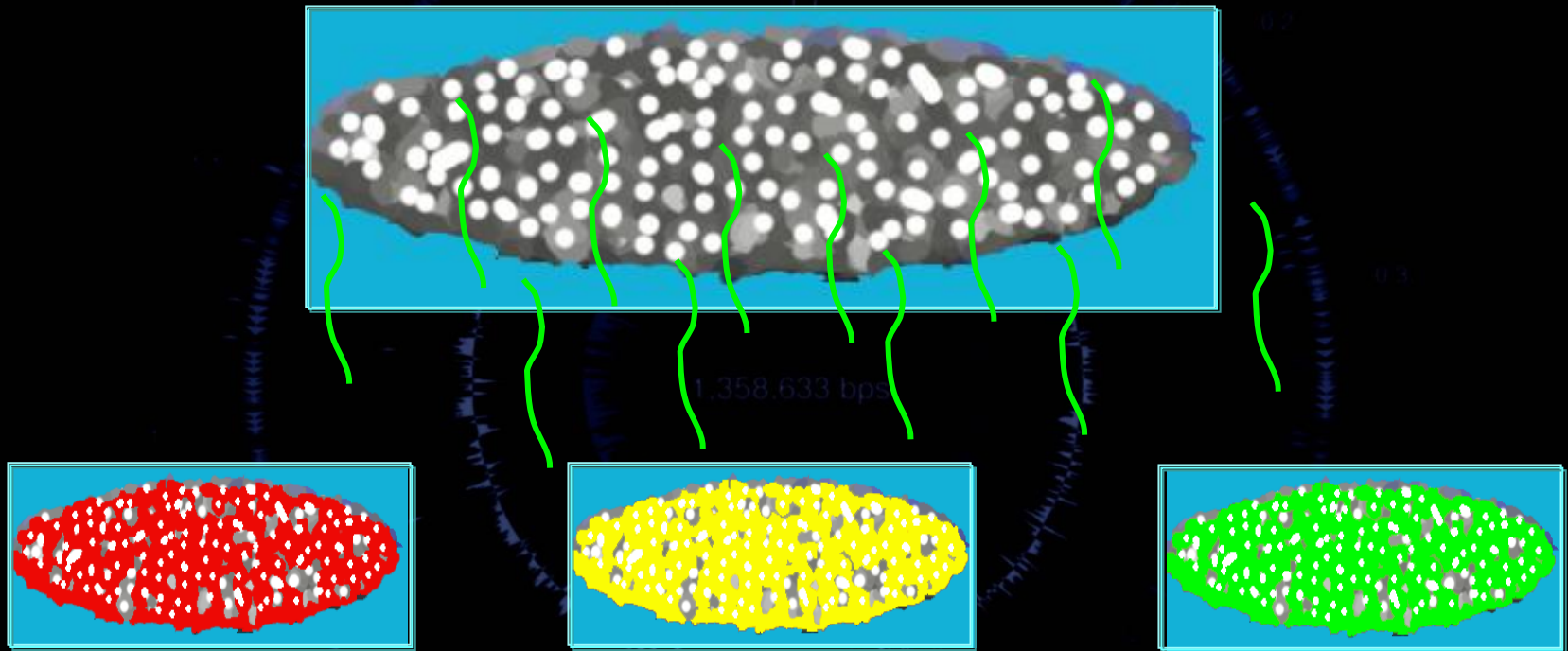
Οι ανιχνευτές διαπερνούν το κυτταρικό
τοίχωμα
μέσω των πόρων



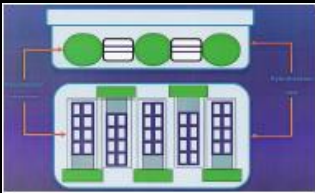
και υβριδοποιούνται στα άθικτα
ριβოსώματα.

FISH -

Έκπλυση των μη προσδεμένων ανιχνευτών ==>

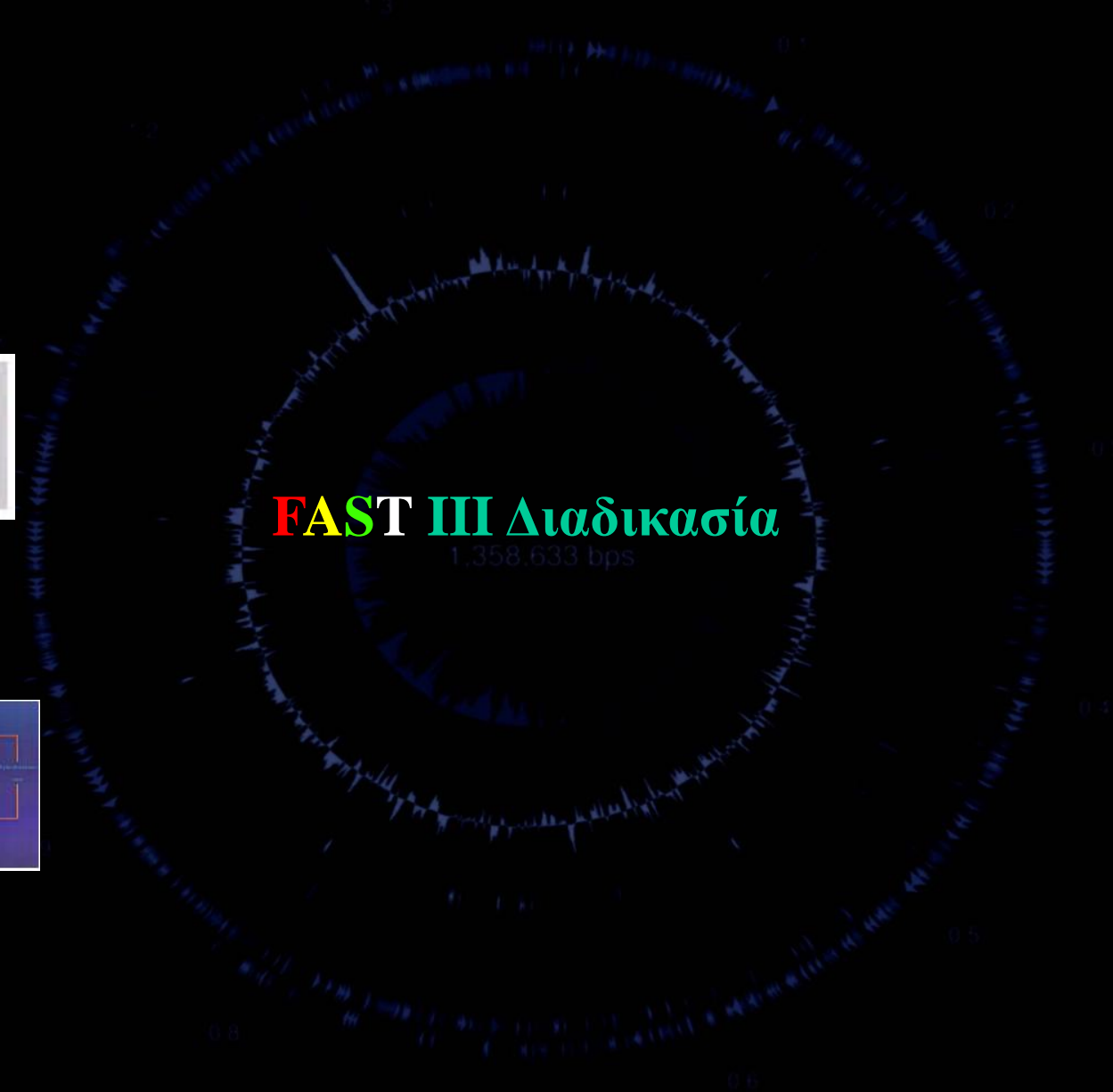


Τα κύτταρα «βάφονται» από τους σεσημασμένους ανιχνευτές οι οποίοι έχουν προσδεθεί σε αλληλουχίες rRNA ειδικές για κάθε είδος.



FAST III Διαδικασία

1,358,633 bps

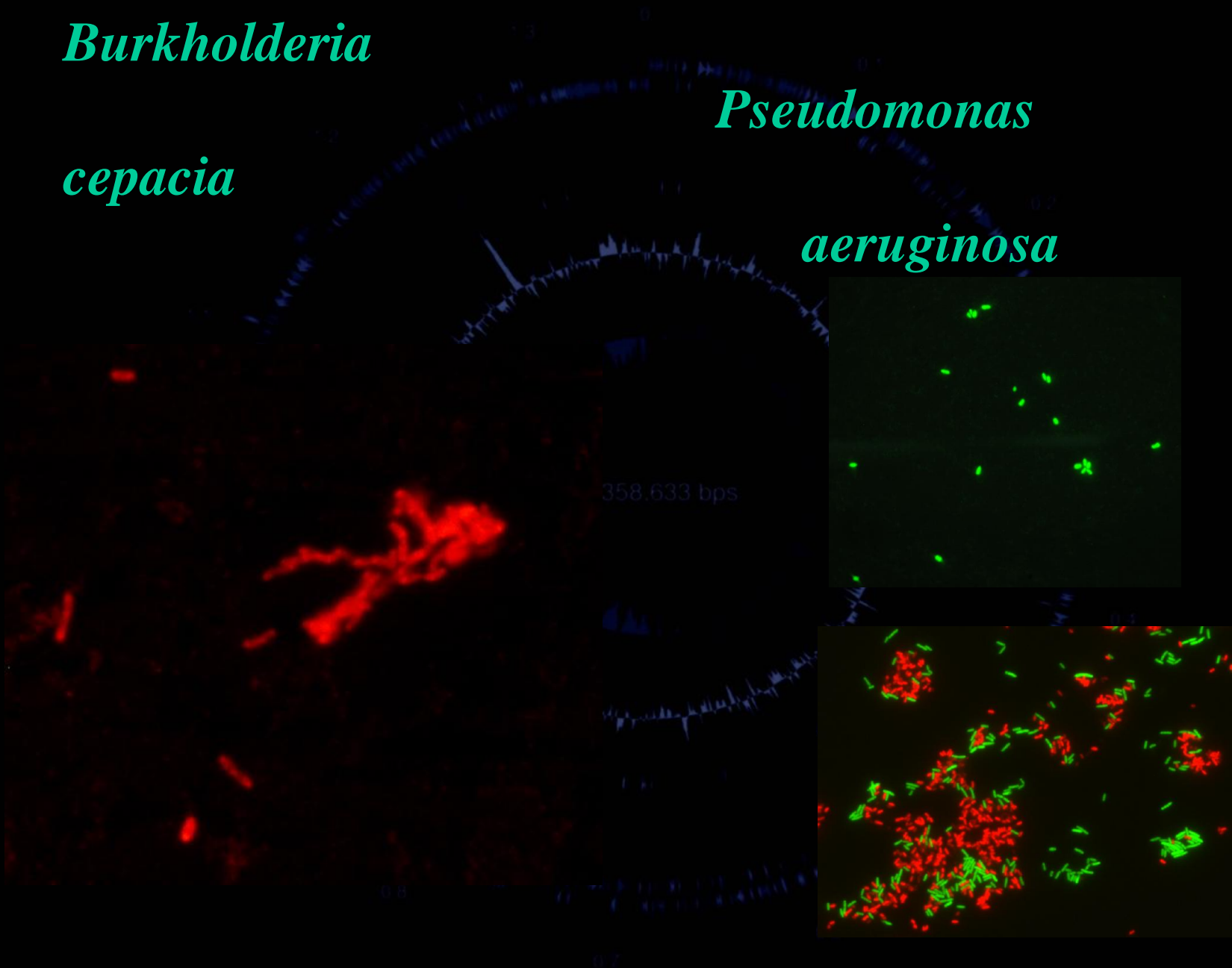


Burkholderia

cepacia

Pseudomonas

aeruginosa

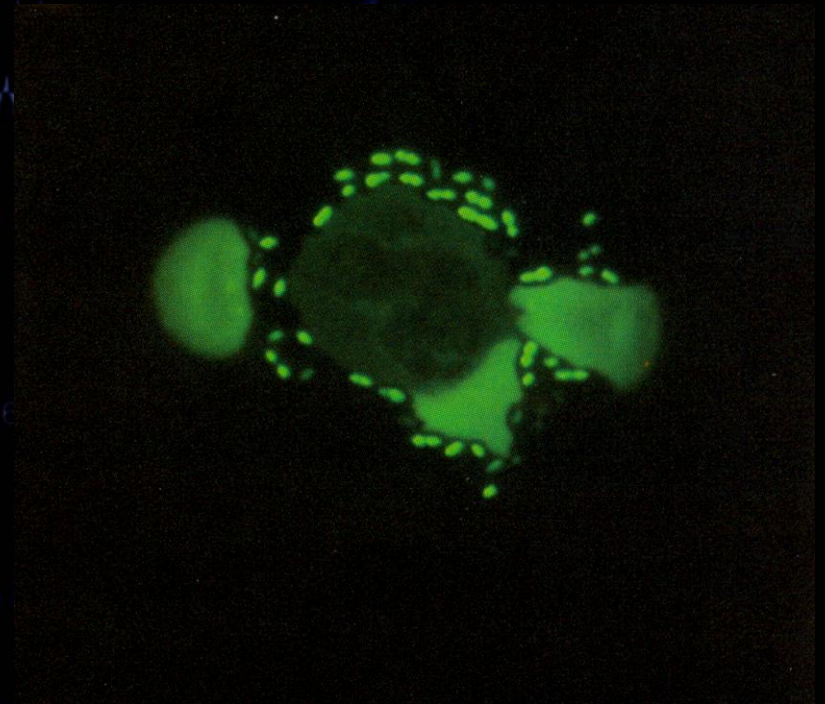


Μηνιγγίτιδα

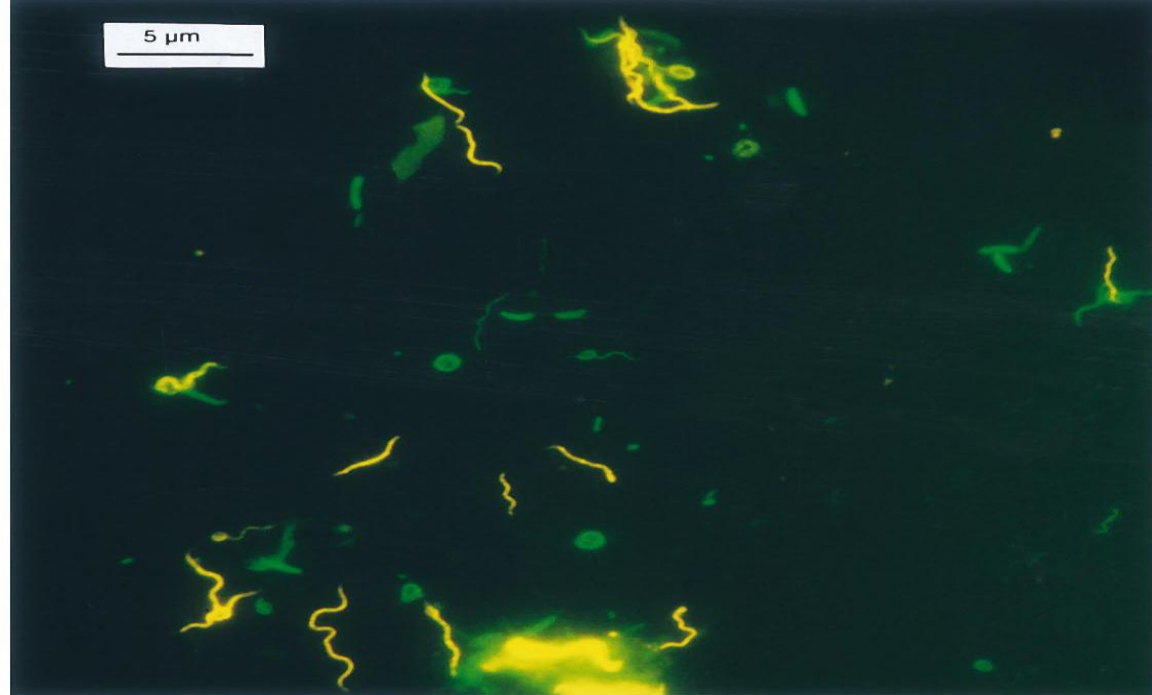
Poppert S. **Και συν.**, JCM(2005) 43(7): 3390-3397



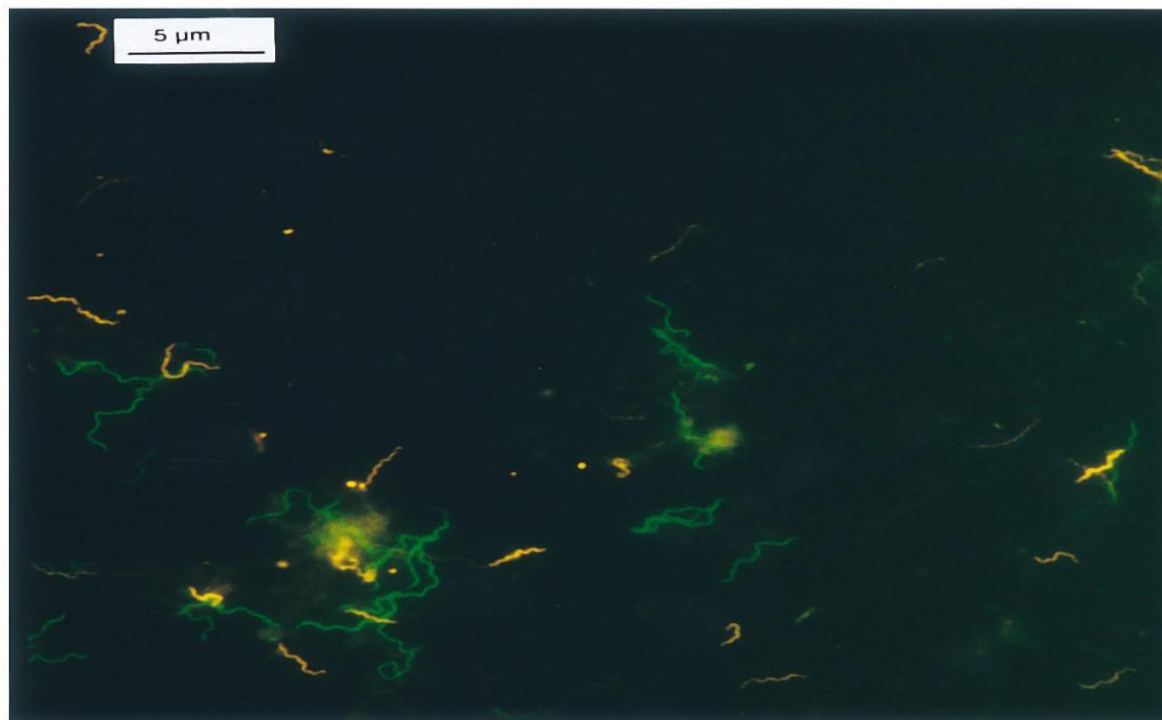
Streptococcus pneumoniae
Ανιχνευτής ειδικός για τον *S. pneumoniae*.



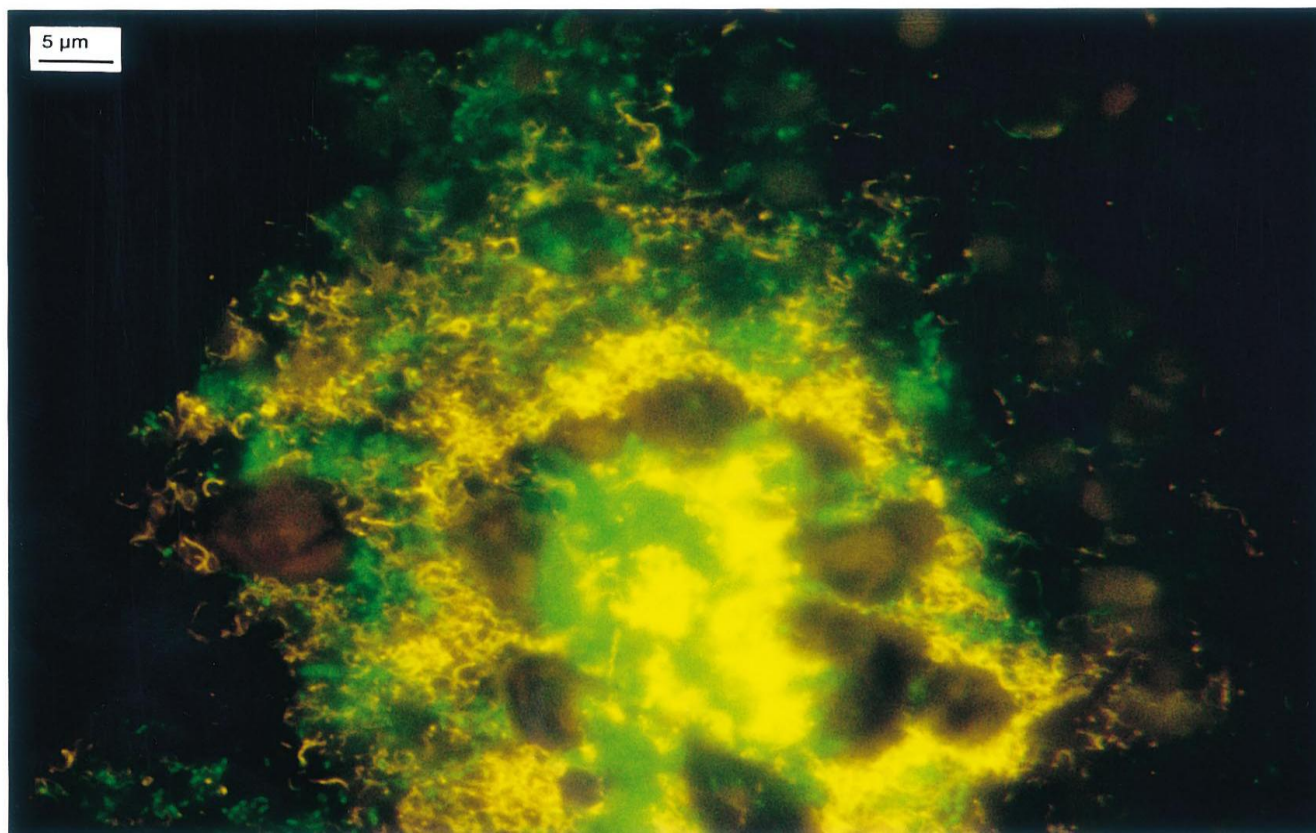
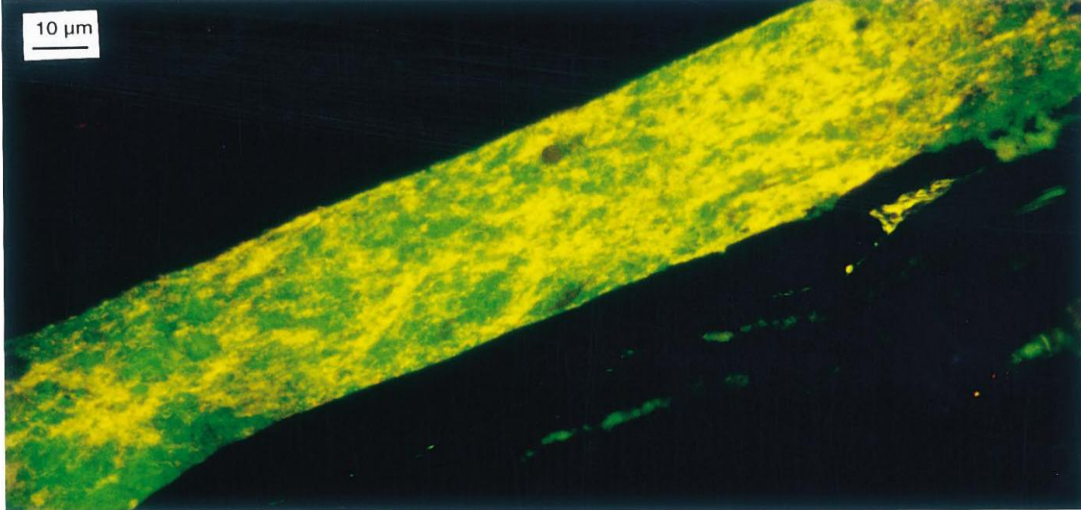
Streptococcus pneumoniae
«universal» ανιχνευτής που υβριδίζεται με το 16S rRNA όλων των βακτηρίων (control).



a



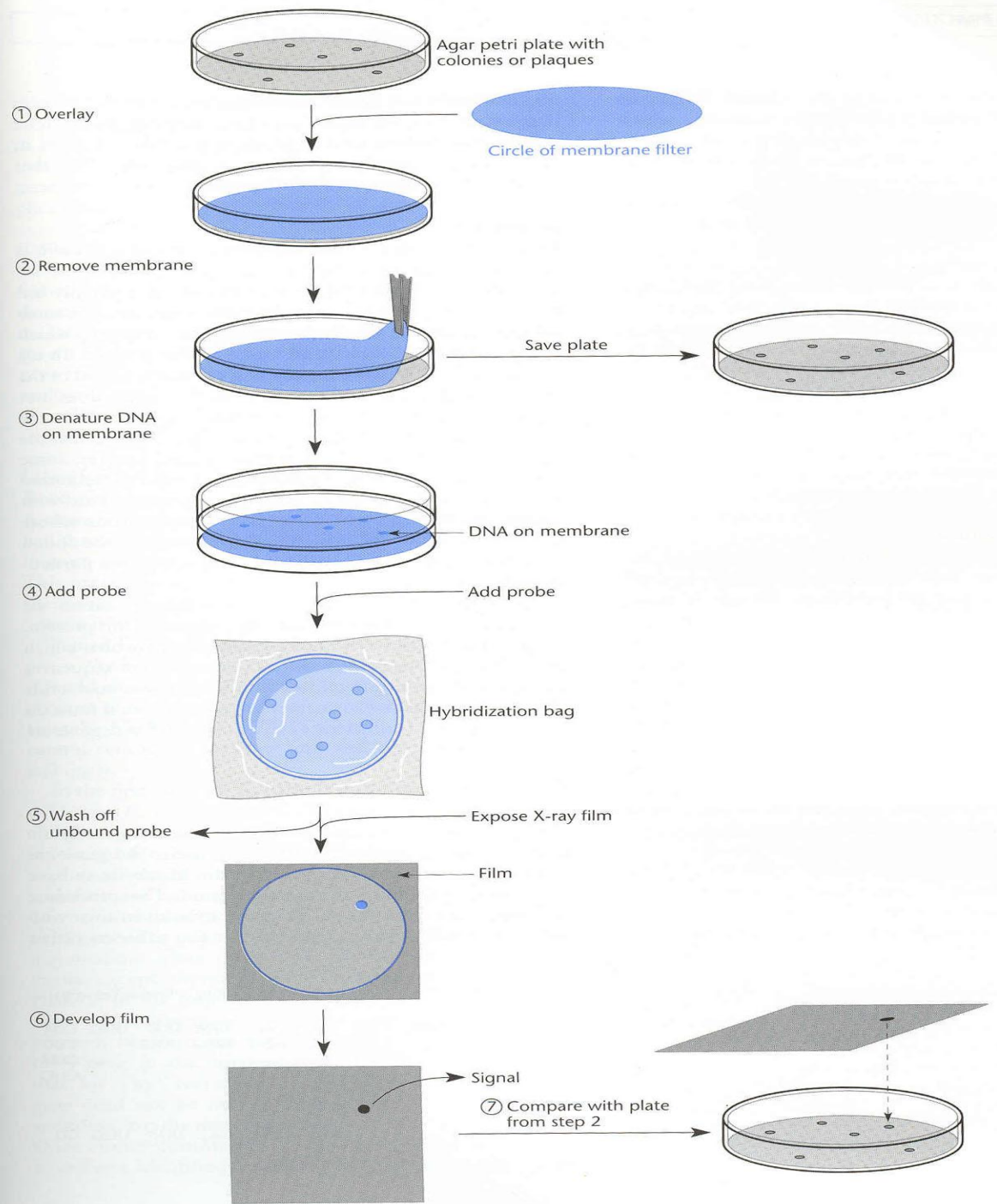
b



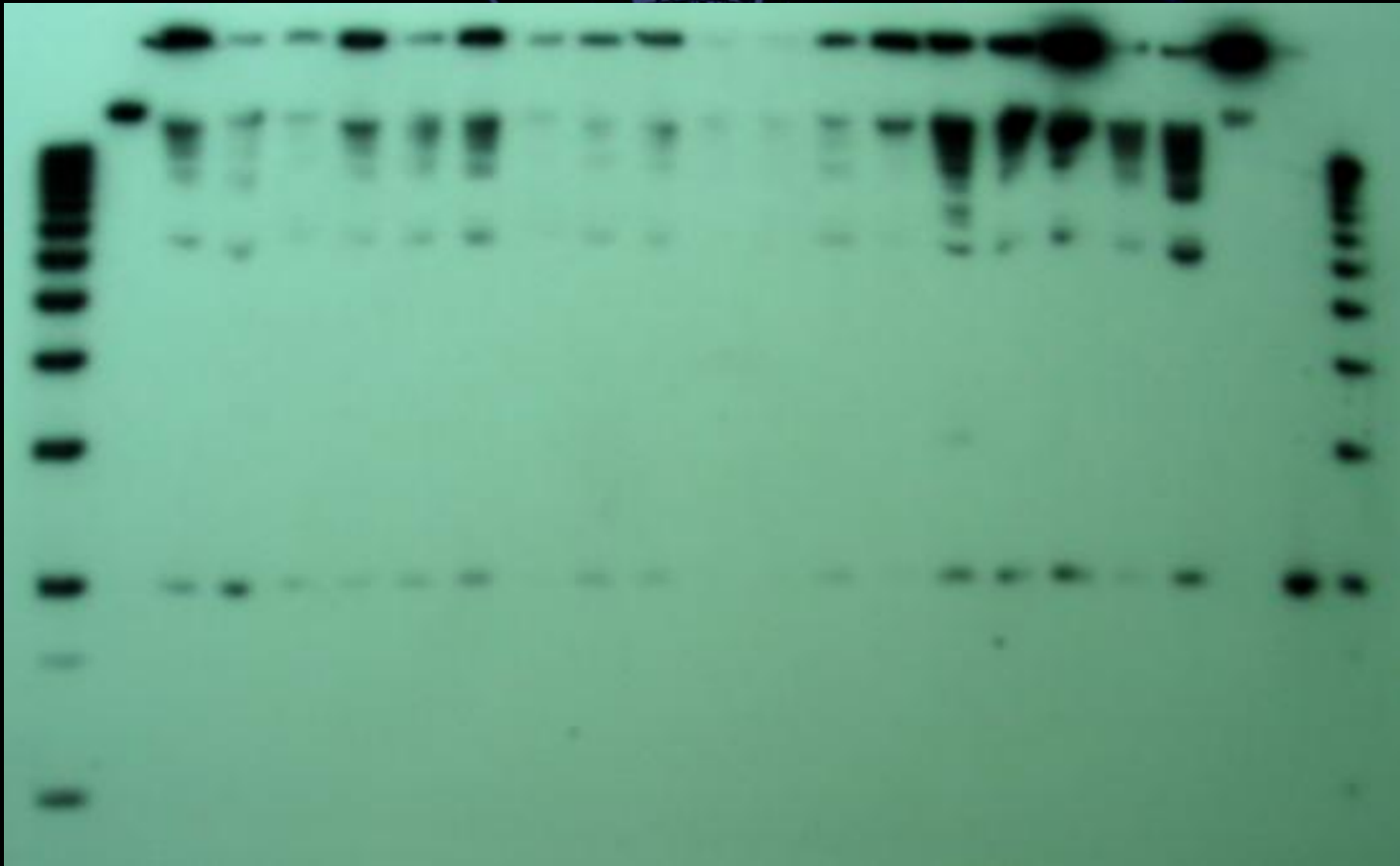
Πλεονεκτήματα έναντι της PCR

- Δεν απαιτείται εξειδικευμένο εργαστήριο για την εφαρμογή της μεθόδου.
- Δεν απαιτείται ειδικός εξοπλισμός.
- Δεν απαιτείται απομόνωση γενωμικού DNA.
- Δεν επηρεάζεται από επιμολύνσεις.
- Η μορφολογία παραμένει και μπορεί να μελετηθεί άμεσα ή και μετά από ημέρες.
- Εντοπισμός μικτών λοιμώξεων.
- Ταχύτερη μέθοδος και σε συνθήκες εργαστηριακής ρουτίνας επιτυγχάνεται ίδιος βαθμός ευαισθησίας με αυτόν της PCR.

Colony blot



Υβριδισμός χρωμοσωμικού DNA κατατετμημένου με *Cla*I, με το γονίδιο *vanA*



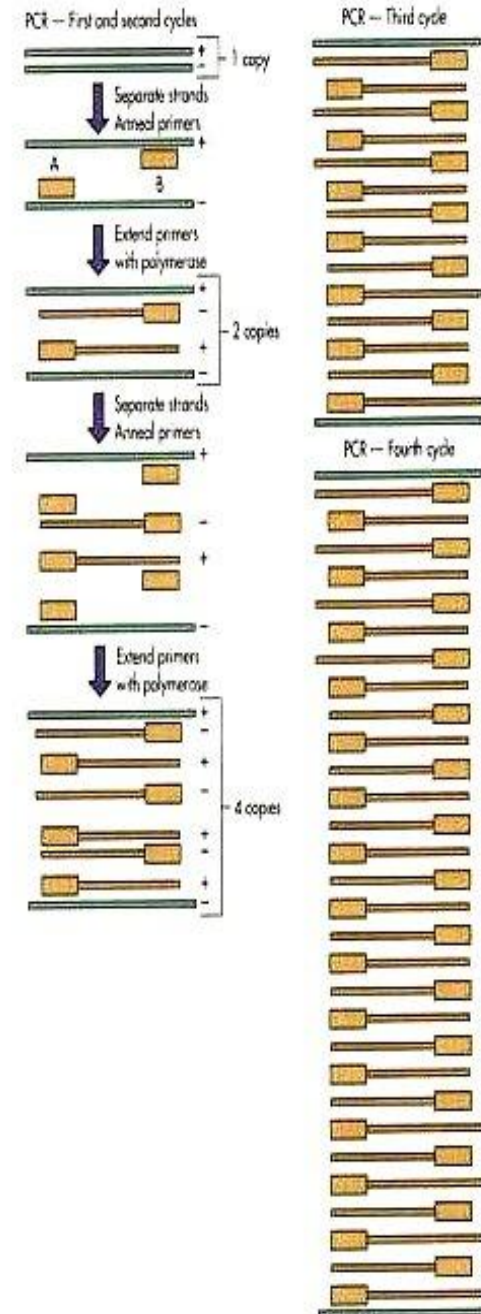
Μέθοδοι πολλαπλασιασμού του νουκλεϊνικού οξέος

- Πολλαπλασιασμός του στόχου (PCR)
- Πολλαπλασιασμός του ανιχνευτή (LCR)
- Πολλαπλασιασμός του «σήματος»
(bDNA)

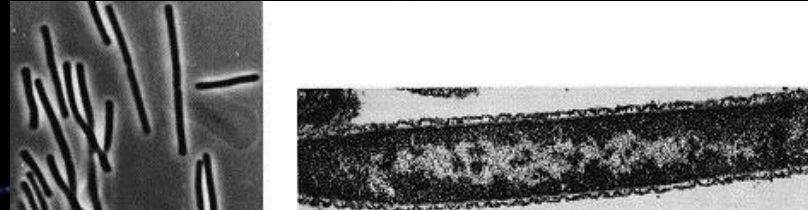
Αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης Polymerase Chain Reaction : PCR

1,358,633 bps

- ❖ Ταχύτητα
- ❖ Υψηλή ευαισθησία
- ❖ Ειδικότητα (;)

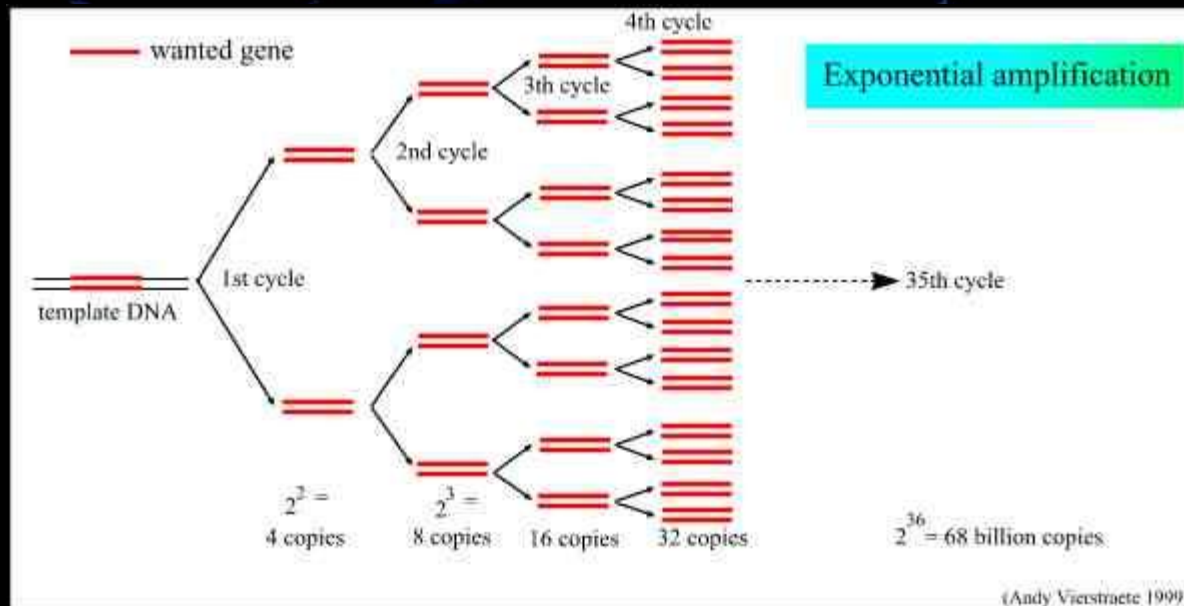
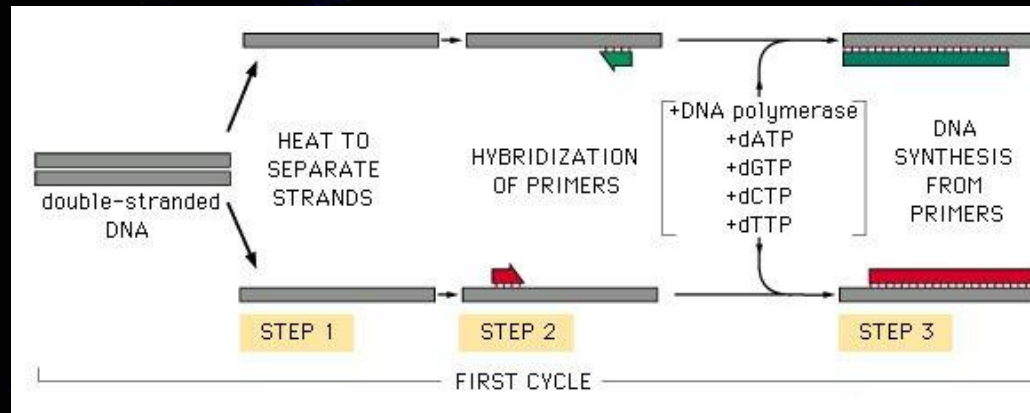


Thermus aquaticus



Το βακτήριο *Thermus aquaticus* ανακαλύφθηκε σε νερά θερμοπηγών στο Great Fountain του Lower Geyser Basin στο Yellowstone National Park

Αρχές της PCR



Polymerase Chain Reaction

Ιδιαιτερότητες της PCR στη Βακτηριολογία

- Επεξεργασία δείγματος
- Παρουσία αναστολέων της Taq πολυμεράσης
- Ενδοκυττάρια βακτήρια
- Επιλογή DNA-στόχου
- Αξιολόγηση αποτελέσματος!

RISKS

MEASURES

Vertical contamination (previous amplifications)



•Prevention

- Use separate, dedicated, and controlled rooms
- Wearing gloves, caps and coats
- PCR performed in closed system
- Avoiding positive control (suicide-PCR)

- Uracil-DNA-glycosylase/dUTP use

•Detection

- Running one negative control for 5 samples

Horizontal contamination (carry-over)



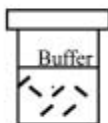
•Prevention

- PCR performed in closed system

•Detection

- Running one negative control for 5 samples
- Use as a positive control the same bacterium species as those searched but which are not usual pathogens
- Sequencing all the amplicons

Water and Reagent's contamination



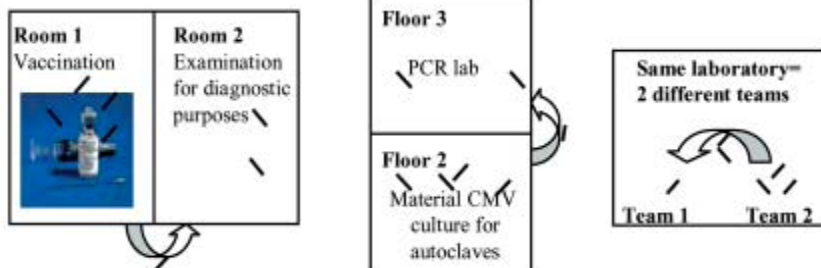
•Prevention

- Digestion with restriction enzymes

•Detection

- Use Mix as negative control
- Confirm PCR using a second gene

Neighboring contamination



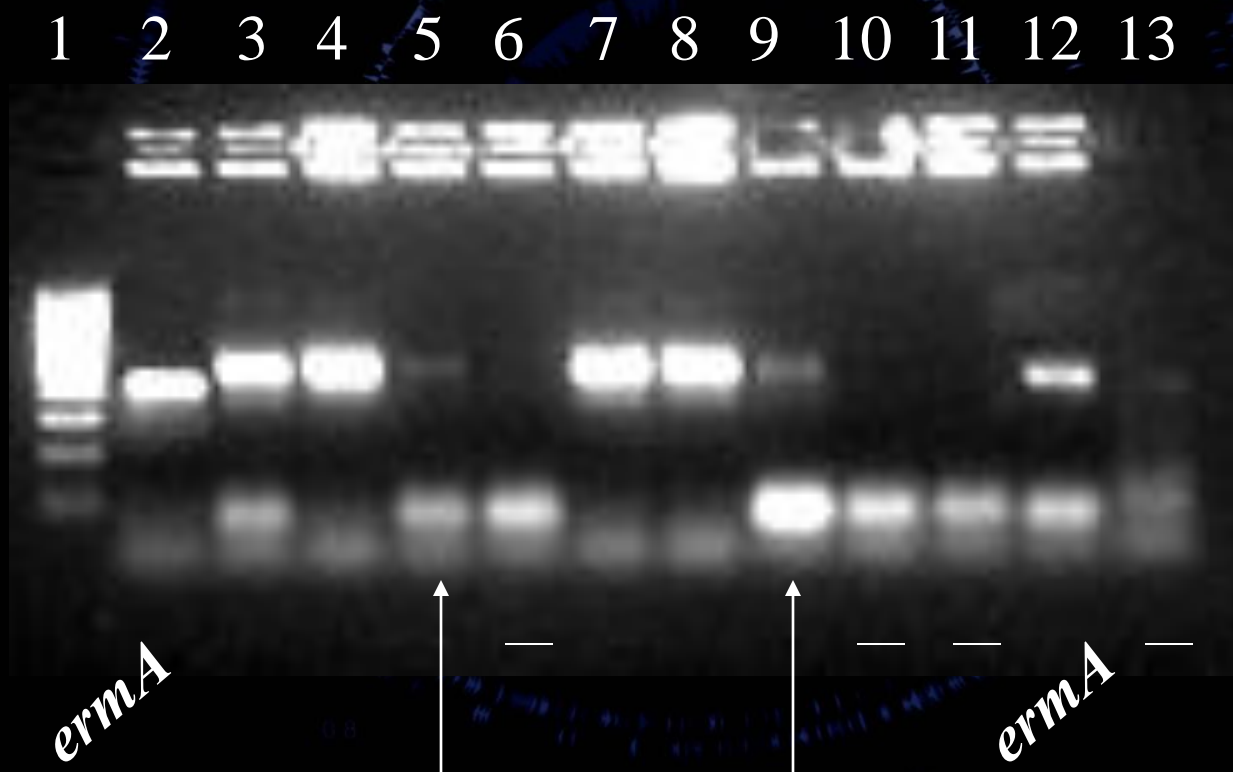
•Prevention

- Communication between teams to be sure that the basic rules are applied
- Close the laboratory

•Detection

- Running one negative control for 5 samples

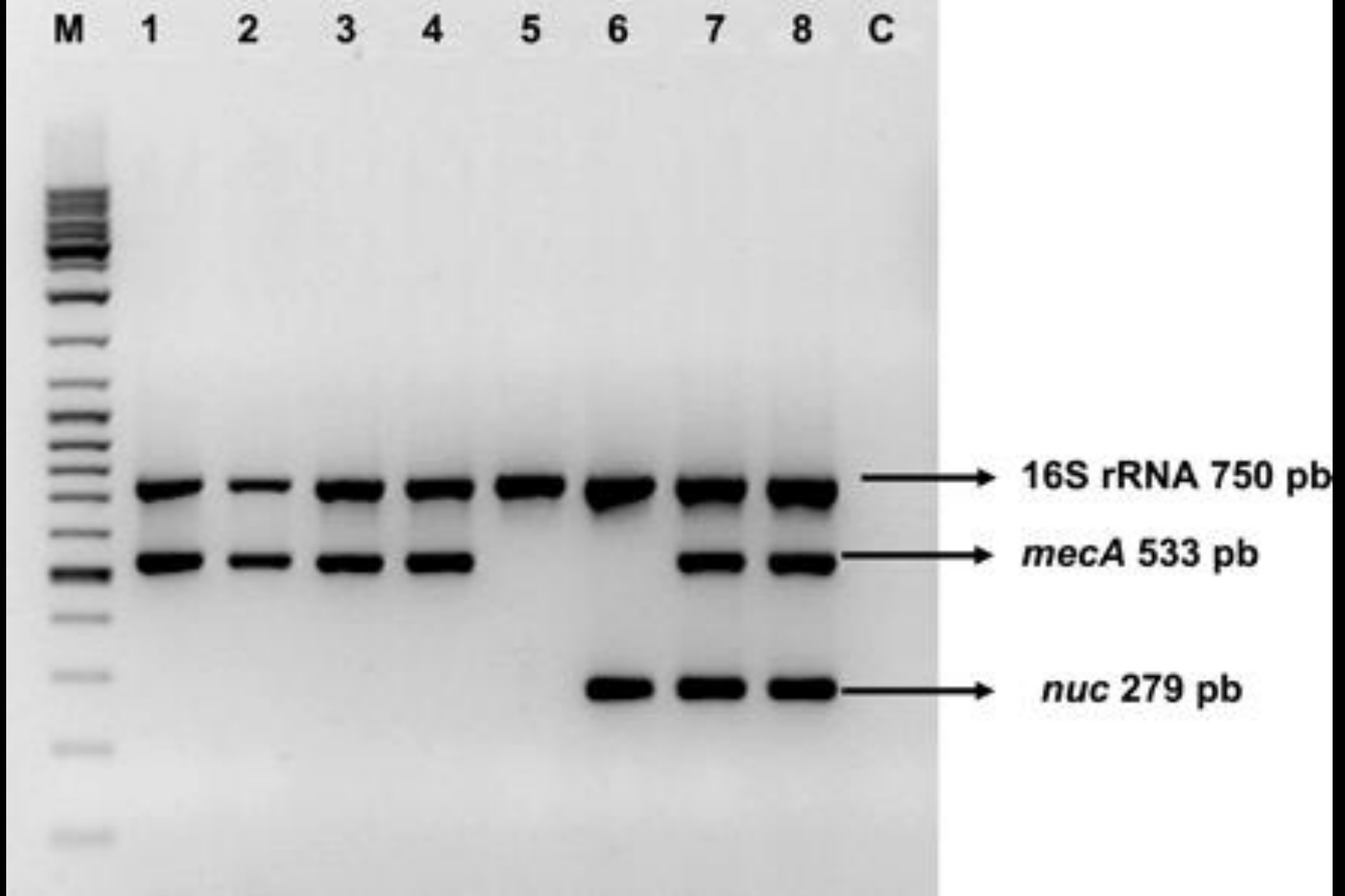
Ηλεκτροφόρηση των προϊόντων PCR για τα γονίδια *ermA* και *ermC*



Ηλεκτροφόρηση σε αγαρόζη των προϊόντων PCR για το γονίδιο *vanA*

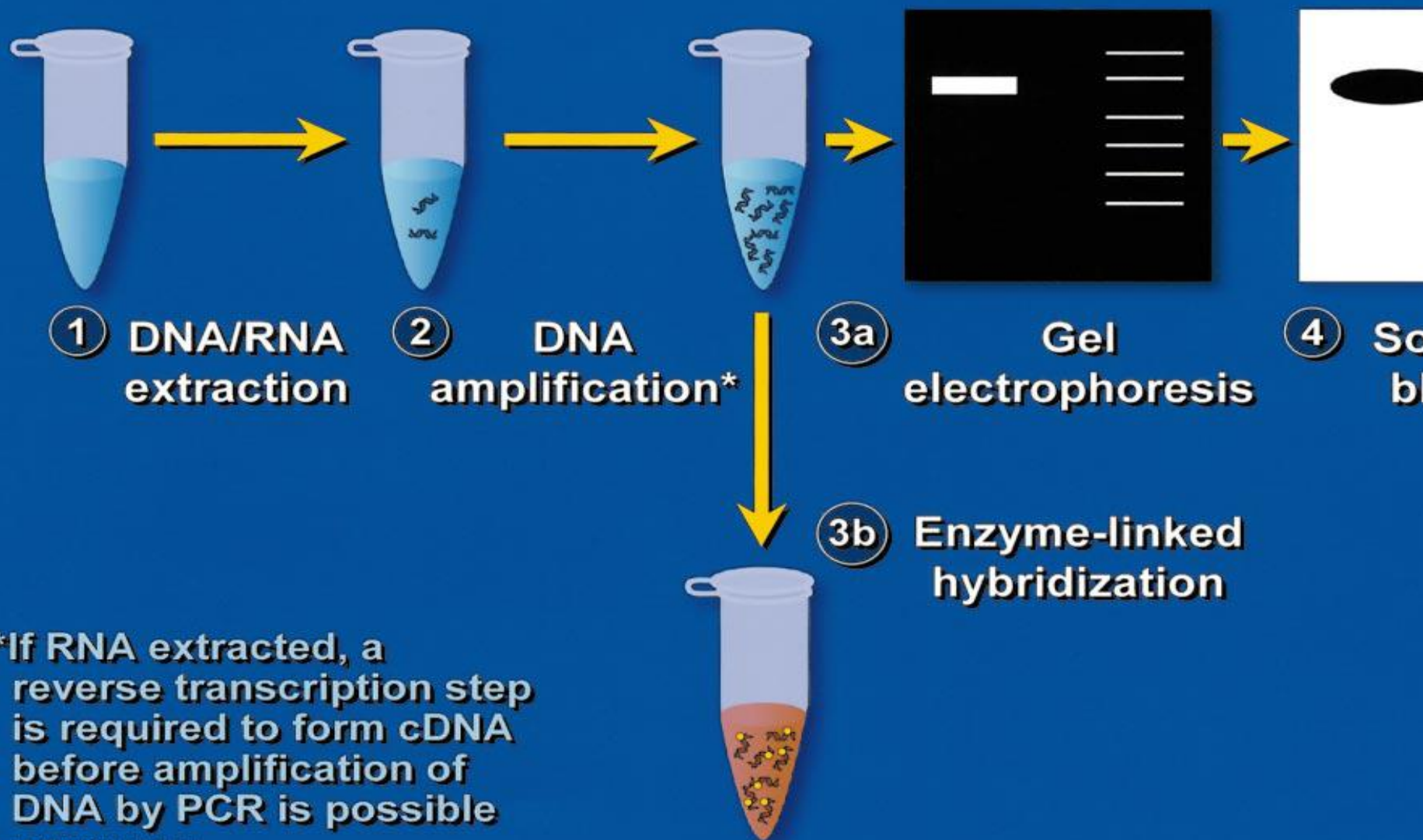
- εκκινητές:
- *vanA1*: 5'-atg gca agt
cag gtg aag atg g-3'
- *vanA2*: 5'-tcc acc tcg
cca aca act aac g-3'
- *vanB1*: 5'-tct gtt tga att
gtc tgg tat-3' •459 bp
- *vanB2*: 5'-gac ctc gtt
tag aac gat g-3'





Lanes 1-4, MRCoNS; lane 5, MSCoNS; lane 6, MSSA; lanes 7 and 8, MRSA; lane C, negative control

Conventional PCR-Based Testing Formats



*If RNA extracted, a reverse transcription step is required to form cDNA before amplification of DNA by PCR is possible

Γιατί να χρησιμοποιούμε την PCR?

- Μεγάλη ευαισθησία (1 copy – 10 copies DNA)
- Ανιχνεύει μικροοργανισμούς που δεν καλλιεργούνται
- Σύντομη μέθοδος (< 24 hrs)

Μειονεκτήματα της PCR

- Απαιτήσεις τεχνολογικές
- Κόστος
- Κίνδυνος επιμολύνσεων
- Αυστηρές συνθήκες εργασίας

real-time real-time
real-time PCR
real-time
hardware

- Intuitive programming
- Fast and accurate performance
- Flexibility for multiple users
- Small footprint

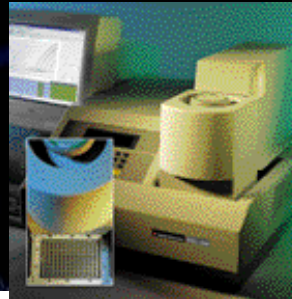


The optical module fits on the iCycler base unit, offering you Real Time Quantitative PCR* capability.

iCycler
BioRad



LightCycler
Roche



5700
Applied Biosystems



7700
Applied Biosystems

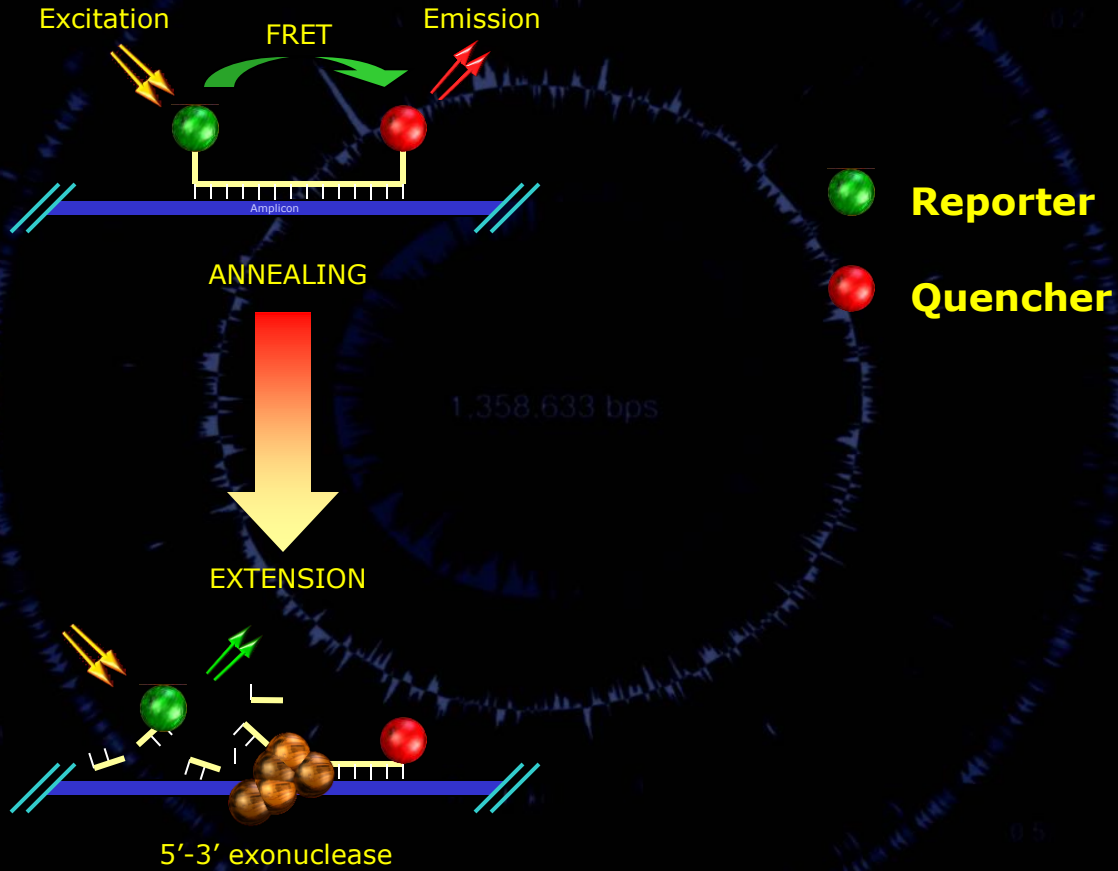


FluorTracker
Stratagene



FluorImager
Molecular Dynamics

real-time real-time
real-time
real-time
TaqMan



real-time real-time
real-time
LightCycler
Hardware



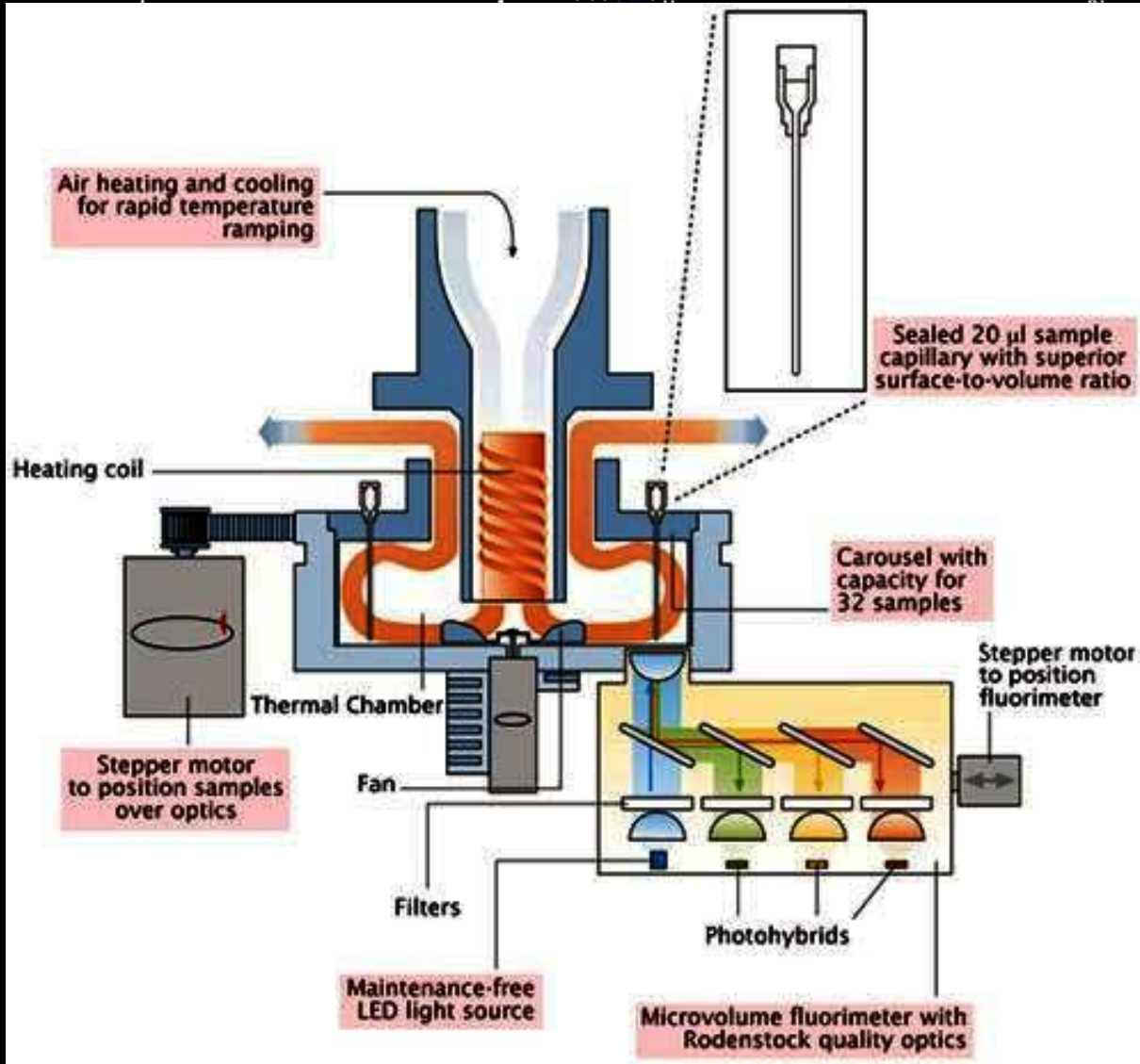
- Προσδιορισμός πραγματικού χρόνου
- Ποσοτικό αποτέλεσμα
- ανιχνευτές που υβριδοποιούνται
- Προσδιορισμός 2 στόχων
- χρήση τριχοειδών (10-20ul)
- 32 δείγματα / 60 minutes
- Κλειστό σύστημα-επιμολύνσεις;

LightCycler

Roche

LightCycler

real-time real-time
LightCycler
real-time
Hardware



real-time real-time
LightCycler
real-time
FRET

*FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer)
using adjacent hybridization probes*



Analysis

Fit Points

Second Derivative Maximum

Baseline Adjustment

None

Arithmetic

Proportional

Normalized

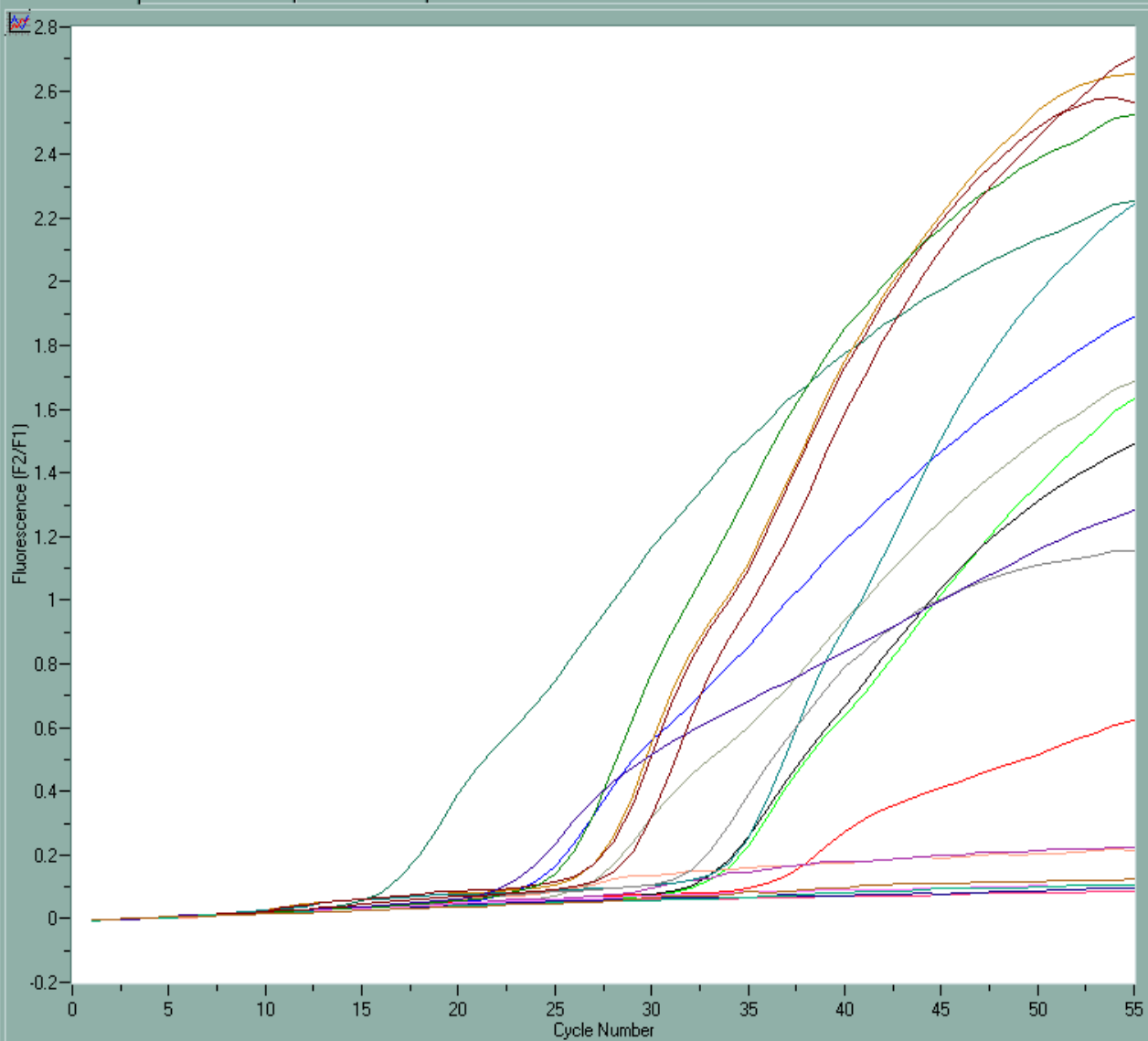
Number of Points

2

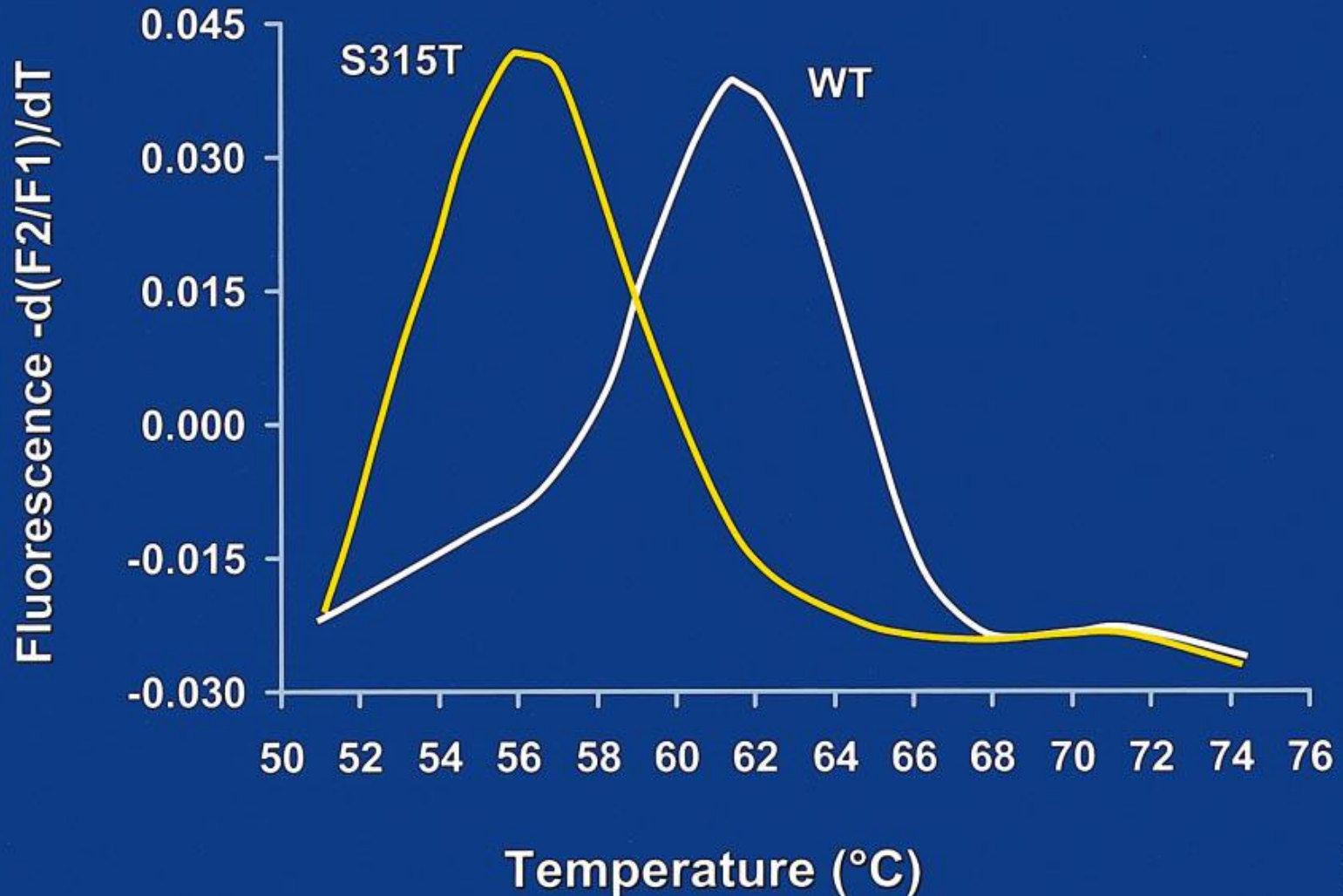
Show Fit Points

P...	Name	Cro...
1	46008298 (NM)	7.973
2	46933369 (NM)	7.379
3	47092399 (NM)	7.357
4	46933369 (NM)	7.955
5	21 - N lactamica (NM)	7.815
6	32 - N mening (NM)	8.095
7	33 - N subflava (NM)	7.932
8	31 - N gono (NM)	6.742
9	water (NM)	9.400
10	water (NM)	7.207
11	51874305 (HSV)	7.189
12	45712869 (HSV)	7.447
13	51871828 (HSV)	7.901
14	45711982 (HSV)	8.445
15	45712947 (HSV)	7.306
16	45717688 (HSV)	7.777
17	45718536 (HSV)	7.640
18	40317540 (HSV)	7.619
19	water (HSV)	7.796
20	water (HSV)	9.717

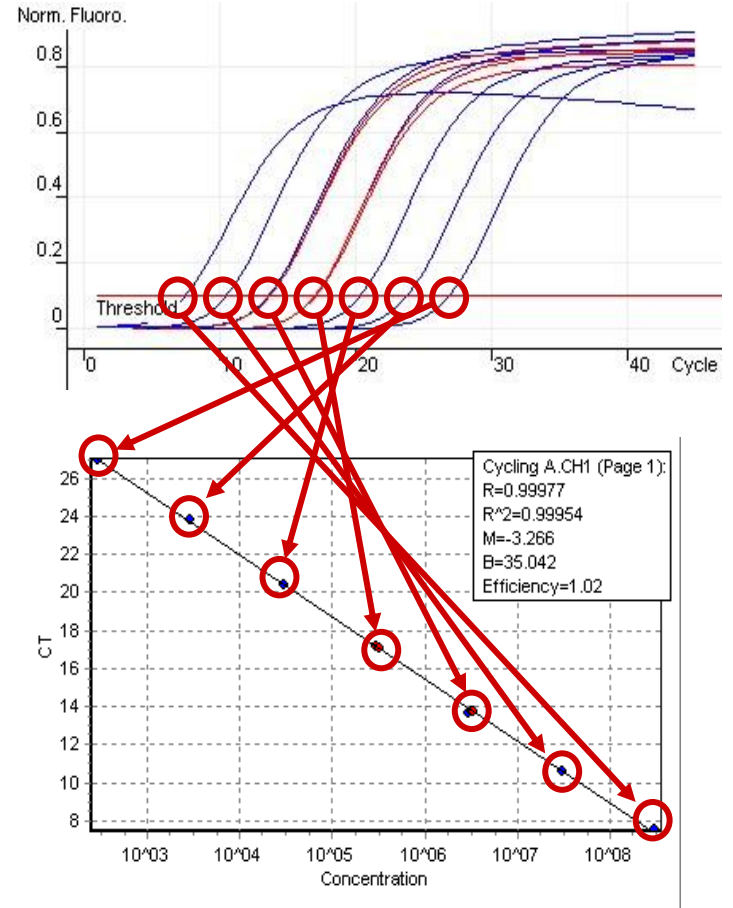
Step 1: Baseline Step 2: Noise Band Step 3: Analysis



Melting Curves for Wild Type *katG* and S315T *katG*



REAL-TIME PCR



Source: Celtic Diagnostic

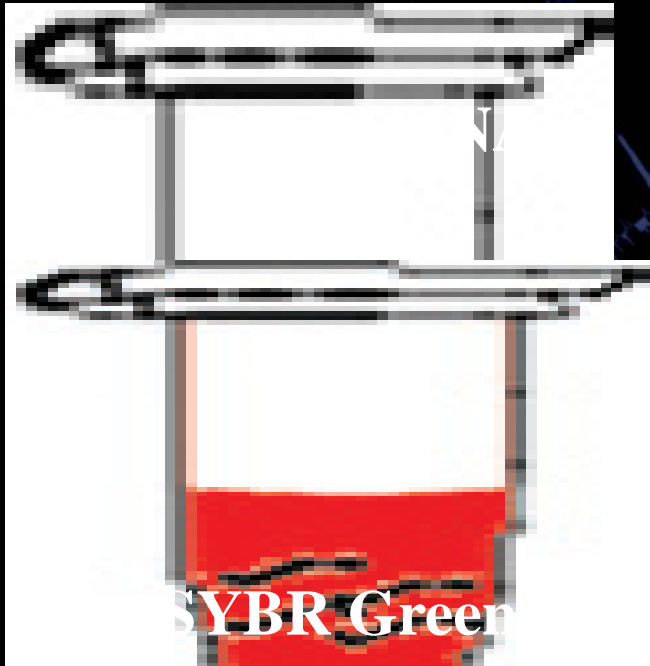
Πλεονεκτήματα της REAL-TIME PCR

- ✓ Σύντομη (1 hour)
- ✓ αριθμός δειγμάτων (~200 ημερησίως)
- ✓ χαμηλή συχνότητα επιμολύνσεων (κλειστά συστήματα)
- ✓ μεγάλη ευαισθησία (3pg or 1 genome eq of DNA)
- ✓ μεγάλο εύρος μέτρησης ($10 - 10^{10}$ copies)
- ✓ επαναληψιμότητα (CV < 2.0 %)
- ✓ ποσοτικός προσδιορισμός
- ✓ λειτουργία με βάση το πρόγραμμα
- ✓ κόστος;

Μειονεκτήματα της *REAL-TIME PCR*

- Περιορισμός στον αριθμό των στόχων που προσδιορίζονται (δύο).
- Η ανάπτυξη νέου πρωτοκόλλου απαιτεί γνώσεις και ικανότητες
- Υψηλό κόστος

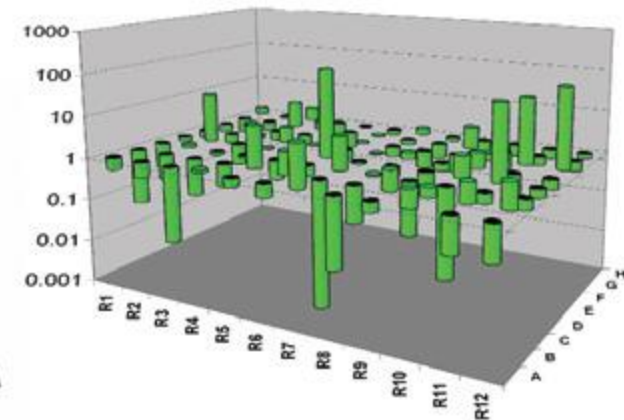
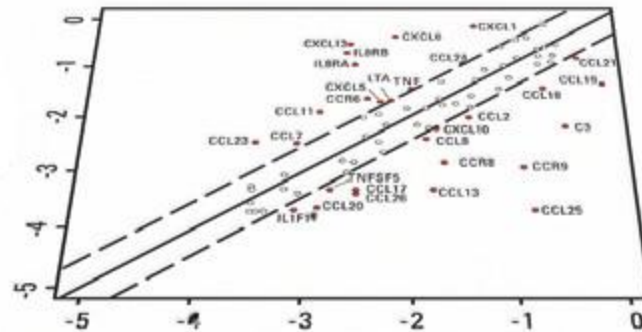
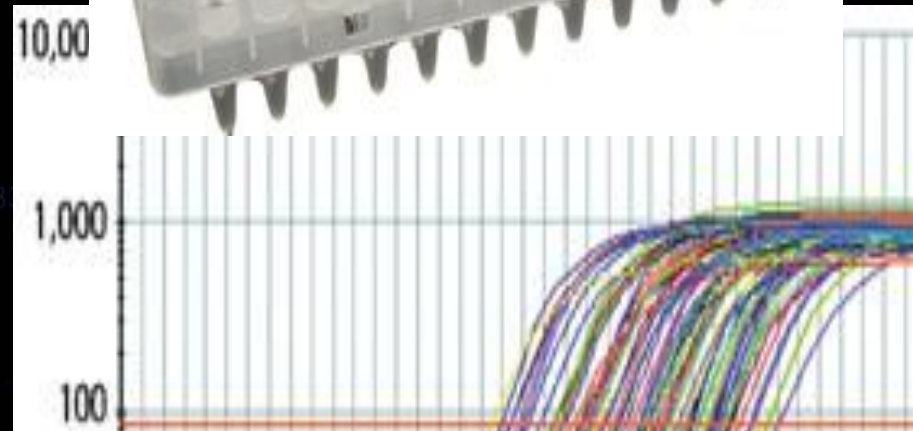
PCR Arrays: RT-PCR και microarrays



SYBR Green

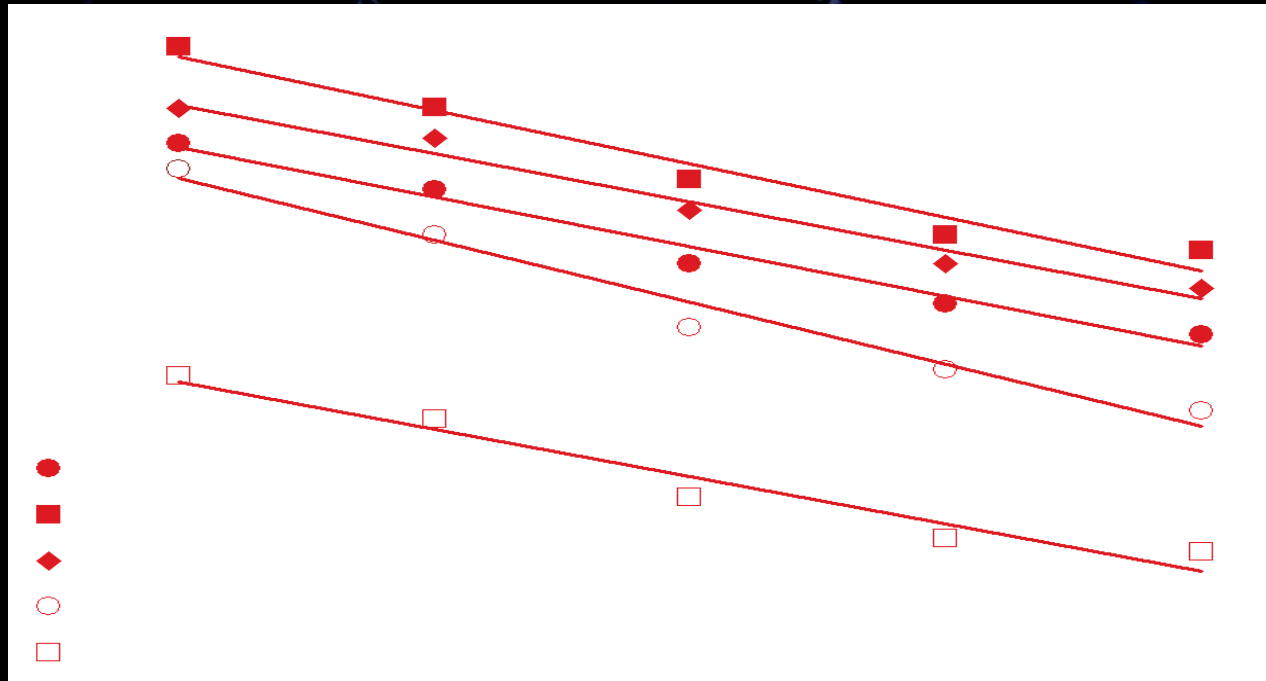


PCR



ΕΥΑΙΣΘΗΣΙΑ

Thresh
old
Cyc
le
(Ct)



RNA (ng / array)

ΕΙΔΙΚΟΤΗΤΑ

