

Environmentální aplikace molekulární biologie

Petra Jančová, Kristýna Maršálková, Jana Šerá, Hana Pištěková

Ústav Inženýrství Ochrany Životního Prostředí,
Fakulta Technologická, Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně;
jancova@ft.utb.cz

Souhrn

Metody molekulární biologie jsou využitelné v různých oblastech biologického výzkumu i praktických aplikací. Přinášejí informace o organismu, které jsou získány na základě analýzy molekul proteinů nebo DNA. Molekulární markery jsou důležitým nástrojem pro taxonomické a evoluční studie. Pomocí metod molekulární biologie je možné detekovat v podstatě jakýkoliv gen z jakéhokoliv organismu. Uplatnění nacházejí vedle klasické PCR i další metody, jako například její modifikace Real-time PCR, ale také DGGE nebo sekvenování. Tyto metody mohou být aplikovány k identifikaci významných mikroorganismů podílejících se na bioremediacích nebo v procesu čištění odpadních vod.

Klíčová slova: PCR, Real-time PCR, DGGE

Summary

Molecular biology methods represent specific and heterogeneous group of analytical procedures used by different laboratories and scientific disciplines. These methods provide information about organisms obtained by protein or DNA analysis. Molecular markers are an essential tool in taxonomic or evolutionary studies. Molecular biology methods are capable to detect any gene which is present in any organism. Methods such as polymerase chain reaction (PCR), real-time PCR, denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and sequencing are widely used. These methods can be applied to identify the important microorganisms involved in bioremediation or wastewater treatment process.

Key words: PCR, Real-time PCR, DGGE

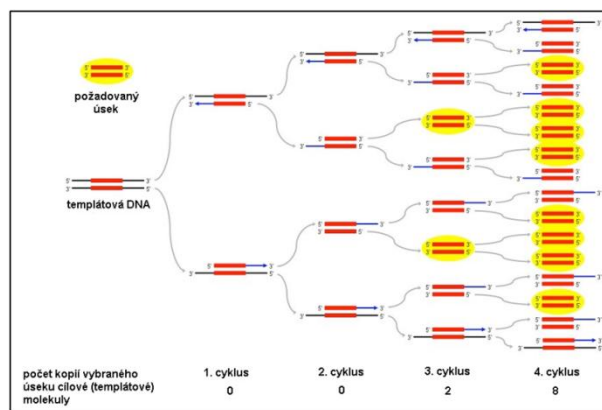
Úvod

Molekulárně biologické metody představují specifickou, poměrně heterogenní skupinu analytických postupů, které jsou sdíleny různými laboratorními i vědními obory. Jedná se o metody, které umožňují analýzu biologicky významných molekul, zejména nukleových kyselin (DNA, RNA), které uchovávají a přenášejí genetickou informaci. Tyto metody lze velmi obecně rozdělit do dvou skupin, a to na klasické metody, bez amplifikace cílové sekvence (např. Northern blot, Southern blot, ad.), a metody amplifikační, kde je nejčastěji používanou metodou polymerázová řetězová reakce (PCR). Z PCR se stala rutinní laboratorní technika, díky její zdánlivé jednoduchosti a snadnosti použití je zpřístupněna početným laboratořím. Její výhodou je vysoká specifita a citlivost, zásadním nedostatkem pak možnost kvantifikace. Devadesátá léta 20. století pak přinesla v oblasti molekulární biologie nové technologie pro kvantitativní analýzu.

Cílem tohoto příspěvku je připomenout základní principy metod (PCR, Real-time PCR, DGGE a sekvenování) a ukázat příklady jejich aplikací v environmentální oblasti.

Polymerázová řetězová reakce (PCR, polymerase chain reaction)

Polymerázová řetězová reakce je metoda zmnožení určité sekvence DNA (obr. 1). Její specifita je založena na použití dvou výchozích primerů (nukleotidových jednotek), které hybridizují s komplementární sekvencí opačných vláken DNA a ohraničují žádanou sekvenci. Vzorek DNA je nejdříve zahříván, aby se oddělila obě vlákna (denaturace), primery se nechají navázat na DNA (annealing) a každé vlákno je kopírováno DNA-polymerasou počínajíc od primeru (elongace). Dvě vlákna DNA pak slouží jako matrice pro syntézu nové DNA, ze dvou primerů. Opakování cyklů denaturace, připojení primerů k jejich komplementárním sekvencím a prodlužování připojených primerů DNA-polymerasou vede k exponenciálnímu množení vybraných úseků DNA o definované délce [1,2].



Obr. 1: Princip standardní PCR

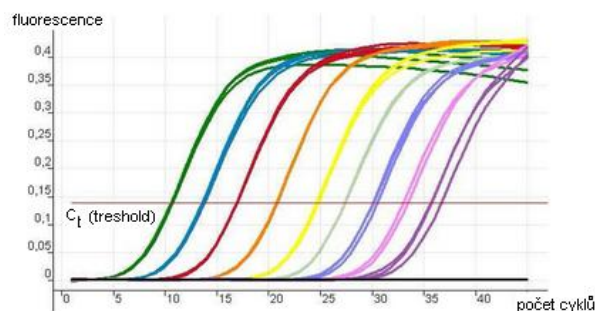
(převzato z: <https://www.slideshare.net/ouopened/polymerase-chain-reaction-pcr-lecture>)

Pomocí PCR je možné detekovat v podstatě jakýkoliv gen z jakéhokoliv organismu. PCR se stala významnou metodou v detekci a kvantifikaci sledovaných bakterií. Tato metoda přináší celou řadu výhod: citlivost, jednoduchost a možnost specifické detekce bakterií. Na druhé straně, je ale velkou nevýhodou PCR to, že se ve svém základním uspořádání používá především ke kvalitativním stanovením.

Polymerázová řetězová reakce v reálném čase (qPCR, Real-time PCR)

Vedle standardní metody PCR se používá řada modifikací. Jednou z nich je Real time-PCR (qPCR), tedy polymerázová řetězová reakce v reálném čase. Je to metoda založena na klasickém PCR. Rozdíl je ale v tom, že Real time-PCR umožňuje monitorování fluorescence emitované v průběhu polymerázové řetězové reakce jakožto indikátoru amplifikace požadovaného fragmentu v každém cyklu. Takto získané informace, amplifikační křivky (obr. 2), mohou být použity pro kvantifikaci počátečního množství templátu s vysokou přesností v širokém rozsahu koncentrace [3].

Kvantitativní Real time-PCR je často používanou metodou umožňující rychlou a relativně jednoduchou kvantifikaci genové exprese. Absolutní kvantifikace využívá sériově ředěných standardů známých koncentrací pro vytvoření standardní křivky (lineární regresní křivky). Bod, kde fluorescence stoupá nad threshold, tedy prahovou hodnotu pozadí (šum) je označován jako Ct. Z tohoto důvodu, může být hodnota Ct spojena s počáteční koncentrací cílové nukleové kyseliny a slouží jako základ pro absolutní nebo relativní kvantifikaci. Standardní křivka pak vytváří lineární vztah mezi Ct a počátečním množstvím celkové DNA, RNA nebo cDNA, což umožňuje stanovení koncentrace neznámých vzorků na základě jejich hodnot Ct [4]. Pomocí Real time-PCR je možná absolutní kvantifikace počtu kopií DNA sledovaných (preferovaných) markerů pro studované bakterie.

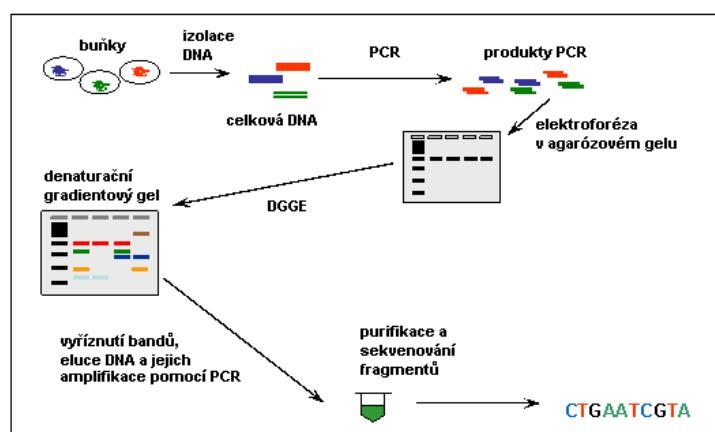


Obr. 2: Standardní amplifikační křivka
(převzato z <http://www.plosntds.org/article/info%3Adoi%2F10.1371%2Fjournal.pntd.0001277>)

Denaturační gradientová gelová elektroforéza (DGGE)

Metoda DGGE je technologie umožňující separaci molekul DNA v polyakrylamidovém gelu (PAGE) na základě odlišné sekvence nukleotidů.

Princip DGGE je založen na „putování“ dvouvláknové DNA gelem rychlostí určenou její molekulovou hmotností až do doby, než vstoupí do části gelu s koncentrací denaturačních látek způsobující denaturaci dvouvláknové DNA (ds DNA) na jednovláknovou (ssDNA). Gel obsahuje lineární gradient koncentrace denaturačního roztoku, zpravidla formamidu a močoviny. Rychlost denaturace DNA závisí na počtu vodíkových můstků mezi nukleotidy – řetězce DNA se od sebe budou snáze oddělovat v místech bohatých na páry adenin (A) – thymin (T) /dva vodíkové můstky/, zatímco úseky bohaté na guanin (G) – cytosin (C) budou stabilnější /tři vodíkové můstky/. Vznikající denaturovaná vlákna putují při elektroforéze pomaleji; jinak řečeno, čím snáze se určitý úsek denaturuje, tím blíže startu se vzorek DNA zastaví. Při DGGE je nutno použít primery s tzv. GC svorkou, která drží komplementární části separovaného fragmentu u sebe i ve fázi, kdy je denaturačně separován. Bylo zjištěno, že použitím GC svorky je dosahováno ostřejších signálů. Konečná pozice fragmentu DNA v gelu pak závisí na denaturačním bodu (obr. 3). Po nabarvení gelu fluorescenčním barvivem je výsledek vizualizován a zachycen pomocí transiluminátoru s UV zářením a snímací technikou [5].

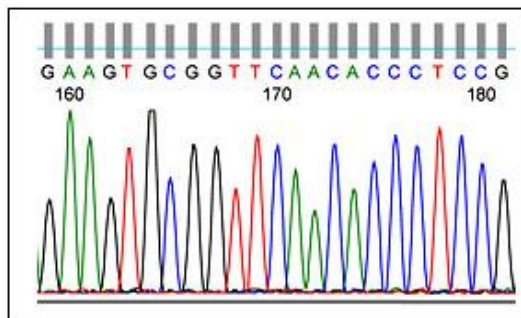


Obr. 3: Schéma znázorňující návaznost jednotlivých metodik při identifikaci bakterií
(převzato z: http://wiki.biomine.skelleftea.se/biomine/molecular/index_11.htm)

V oblasti mikrobiální ekologie vody je tuto techniku možné použít pro analýzu mikrobiálních společenstev ve vzorcích vody. DGGE umožňuje identifikovat členy bakteriálních konsorcií či sledovat jejich vývin.

Sekvenování (stanovení sekvence DNA)

Cílem sekvenování DNA je stanovení pořadí nukleotidů (primární struktury) v molekulách DNA (obr. 4). V posledních dvaceti letech vznikla řada metod označovaných jako „next generation sequencing“ neboli sekvenování nové generace, tj. metod, které v porovnání s klasickými metodami sekvenování (chemická nebo enzymatická metoda sekvenování DNA) umožňují rychle a robustně sekvenovat velké množství vzorků najednou [6].



Obr. 4: Sekvenování DNA

(převzato z: <http://www.ohsu.edu/xd/research/centers-institutes/vollum/core-services/dna/>)

Pro spolehlivou identifikaci mikroorganismů pomocí genetických metod se často využívá stanovení nukleotidové sekvence genu 16S rRNA (gen kóduje 16S podjednotku ribozomální RNA). Tento gen je 1 542 nukleotidů dlouhá RNA, která tvoří složku menší 30S podjednotky ribozomu prokaryot. Vedle oblastí, které jsou všemi mikroorganismy velmi konzervované, obsahuje i oblasti variabilní, jež jsou charakteristické pro každý bakteriální druh. Ze znalosti sekvence a s využitím speciálních počítačových programů, je možno identifikovat jednotlivé bakteriální druhy [7].

PŘÍKLADY KONKRÉTNÍCH APLIKACÍ MOLEKULÁRNĚ BIOLOGICKÝCH METOD

Kvantifikace bakteriálních procesů metodou Real-time PCR

Cílem této studie bylo sledování síran redukujících bakterií (SRB). K tomuto účelu byly využívány molekulárně biologické metody, zejména pak metoda Real-time PCR. Jako vhodný klíčový molekulární marker (znak; cíleně vybraná část celkové informace) byl vybrán gen *dsrA*, gen kódující disimilatorní sulfireduktasu (preferovaný marker pro SRB).

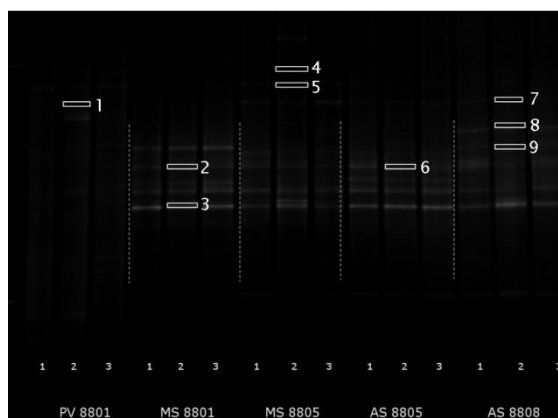
Byly navrženy nové, unikátní, sady primerů schopné detekovat geny kódující enzymy zapojené v sulfátové respiraci (SRB). Následně byly připraveny standardy DNA a standardní křivka byla získána naředěním templátové DNA desítkovým ředěním; následovala analýza metodou Real-time PCR.

Navržená sada primerů byla dále testována na reálném vzorku, jímž byl vzorek důlní vody, ve kterém byl předpokládán výskyt SRB. Po následné analýze metodou Real-time PCR byla odečtena hodnota Ct. Ze standardní křivky pro *dsrA* byla následně odečtena hodnota odpovídající počtu kopií DNA v testovaném vzorku.

V této studii se podařilo detekovat a kvantifikovat síran redukující bakterie. Bylo tedy potvrzeno, že navržená sada primerů a využitá metodika jsou funkční. Porovnáním počtu kopií DNA v jednotlivých reálných vzorcích lze pomocí navržené sady primerů sledovat redukci síranů síran redukujícími bakteriemi.

Využití denaturační gradientové gelové elektroforézy (DGGE) ke stanovení diverzity mikrobiálních konsorcií a vlivu aplikace nutrientů na lokalitě kontaminované organickými polutanty

Byla provedena screeningová studie, kdy byla sledována diverzita a vývoj bakteriálního společenstva na lokalitě s vysokou koncentrací benzenu, toluenu, etylbenzenu a xylenu (BTEX) ve zvodnělé horninové vrstvě. Metoda DGGE zde byla využita ke stanovení diverzity mikrobiálních konsorcií a vlivu aplikace nutrientů. Na lokalitě kontaminované BTEX byly do hloubky pod hladinou podzemní vody aplikovány vybrané nutrienty (NH_4^+ , PO_4^{3-} , NO_3^-). Vzorky podzemních vod na přítoku, uvnitř areálu a na odtoku z lokality byly vzorkovány první den, po týdnu a po měsíci po aplikaci živin. Vzorky vody byly poté zfiltrvány a z filtru byla izolována DNA. Poté byly provedeny 2 po sobě následující PCR reakce s primery FD1, RD1 a 341F GC, 907R. Pro charakterizaci konsorcia mikroorganismů byla provedena denaturační gradientová gelová elektroforéza. DNA obsažená v příslušných bandech byla vyříznuta, amplifikována, purifikována a poté sekvenována. Sekvence byly vyhodnoceny pomocí databáze BLAST (National Library of Medicine).



Obr. XY: Fotografie DGGE gelu. Označené bandy (1-9) byly vyřezány a sekvenovány
/1 – odběr 1. den; 2 – odběr po týdnu; 3 – odběr po měsíci po aplikaci nutrientů/

Pomocí metody DGGE bylo zjištěno, že průběhu vzorkování nedošlo na vybrané lokalitě k velkým změnám ve složení konsorcia. Identifikované mikroorganismy (*Nitrosomonadales*, *Rhodoferrax*, *Azoarcus* sp., *Prolixibacter* sp., *Geothrix fermentans*, *Burkholderiaceae*, *Treponema* sp.) patřily mezi bakterie anaerobní, fakultativně anaerobní, se schopností denitrifikace či dusičnanové respirace a také degradace ropných uhlovodíků. Z výsledků složení konsorcia vyplynulo, že mikrobiální procesy na lokalitě nebyly pravděpodobně ve velké míře omezeny nedostatkem minerálních živin. Výsledek naznačil nedostatek akceptorů elektronů, který limituje mikrobiální procesy. Proto bylo navrženo nové složení živných roztoků a také plán vzorkování pokrývající dobu několika měsíců s častějšími odběry vzorků. Závěrem lze říct, že DGGE je molekulárně biologická metoda s velkým potenciálem pro využití při remediačních procesech.

REFERENCE

- [1] ŠMARDKA a kol. Metody molekulární biologie. 2005. ISBN 80-210-3841-1.
- [2] MURRAY R. K. et al. Harperova Biochemie. 2002. ISBN 80-7319-013-3.
- [3] WILHELM J. and PINGOUD A. Chembiochem, 2003, 4.11: 1120–1128.
- [4] ARYA M. et al. Expert Rev Mol Diagn, 2005, 5(2): 209-219.
- [5] MOLEKULÁRNÍ METODY V EKOLOGII MIKROORGANIZMŮ (EKO/MMEM). CZ.1.07/2.2.00/28.0032.
Dostupné z: <http://www.moloch.upol.cz/uploads/vyukovy-portal/mmem-7-dgge.pdf>.
- [6] SEKVENOVÁNÍ NOVÉ GENERACE. Dostupné z: <http://labguide.cz/sekvenovani-nove-generace/>
- [7] Identifikace mikroorganismů pomocí sekvence jejich genu pro 16S rRNA. VŠCHT. Dostupné z:
<https://www.vscht.cz/files/uzel/0005766/Identifikace+mikroorganism%C5%AF+pomoc%C3%AD+sekvence+jejich+genu+pro+16S+rRNA.pdf?redirected>