Molekularne metode u klasifikaciji bakterija

Majić, Tajana

Undergraduate thesis / Završni rad

2012

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:217:554692

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-29**

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb

zir.nsk.hr

dabar
DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU

PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET

BIOLOŠKI ODSJEK

MOLEKULARNE METODE U KLASIFIKACIJI BAKTERIJA

MOLECULAR METODS IN BACTERIAL CLASSIFICATION

Tajana Majić

Preddiplomski studij molekularne biologije

Undergraduate Study of Molecular Biology

Mentor: Prof. dr. sc. Jasna Hrenović

Zagreb, 2012.

SADRŽAJ

1. UVOD.....2

1.1. Taksonomski stupnjevi.....2

2. HIBRIDIZACIJA DNA.....3

3. DIZAJNIRANJE PROBA ZA ODREĐIVANJE KOLIČINE HIBRIDIZACIJE.....5

3.1 Baze podataka sekvenci nukleinskih kiselina.....5

3.2. Empirijski odabir proba.....5

3.3 Racionalni dizajn proba.....6

3.4. Obilježavanje oligonukleotidnih proba.....6

4. OBLICI HIBRIDIZACIJE OLIGONUKLEOTIDIMA.....7

4.1. Dot-blot/slot-blot i drugi oblici hibridizacije na membrani 7

4.1.1. Kvantitativna slot-blot hibridizacija.....7

4.1.2. Hibridizacija kolonija.....8

4.2. Reverzna hibridizacija.....8

4.3. In situ hibridizacija.....8

5. DNA FINGERPRINTING.....10

5.1. DNA fingerprinting koristeći probu i elektroforezu na agaroznom gelu.....10

5.2. Ribotipiranje.....10

5.3. DNA fingerprinting korištenjem gel elektroforeze u pulsnom polju.....10

5.4. Klasificiranje sojeva pomoću nasumično pojačane polimorfne DNA.....11

6. LITERATURA.....12

7. SAŽETAK.....13

8. ABSTRACT.....13

1. UVOD

Taksonomija je znanost o klasifikaciji organizama. Bakterijska taksonomija se sastoji od klasifikacije, nomenklature i identifikacije. Klasifikacija je smještanje organizama u skupine na temelju sličnosti ili odnosa. Nomenklatura je nadjevanje imena taksonomskim skupinama u skladu s internacionalnim pravilima (Internacionalni Kod Nomenklature Bakterija [Sneath, 1992.]). Identifikacija je praktična primjena klasifikacijskih shema u svrhu određivanja identiteta izolirane bakterije kao člana određenog taksona ili kao člana do tada neidentificirane vrste.

1.1. TAKSONOMSKI STUPNJEVI

U klasifikaciji bakterija koristi se nekoliko razina. Najviša razina je Domena. Svi prokariotski organizmi su smješteni unutar dvije domene, *Arheje* i *Bakterije*. Niže razine su Carstvo, Koljeno, Razred, Red, Porodica, Rod i Vrsta.

Osnovna i najvažnija taksonomska skupina sistematike bakterija je vrsta. Do sredine 1960-ih godina koristila se definicija vrste kao: zasebne skupine sojeva koje imaju određene prepoznatljive značajke i koje su općenito slične jedne drugima u više osnovnih značajki organizacije. Takvo određivanje vrste je napušteno jer je vrlo subjektivno, nije definirano i precizirano. Stackebrandt i Goebel su 1994. Godine na temelju molekularnih metoda zaključili da vrstu čini genetička definicija od 70% srodnosti s 5% ili manje divergencije unutar odgovarajućih sekvenci. Podaci potrebni za takvu definiciju vrste su postali dostupni kada je hibridizacija DNA upotrijebljena za određivanje srodnosti među bakterijama. Najbitniji korak koji prethodi klasifikaciji i identifikaciji bakterija je izoliranje čistih kultura.

U ovom radu bazirati ću se na klasifikaciju bakterija, no budući da se te tri grane bakterijske taksonomije međusobno isprepliću osvrnuti ću se i na ostale.

2. HIBRIDIZACIJA DNA

Hibridizacija DNA se temelji na sposobnosti nativne dvolančane DNA da reverzibilno disocira ili se denaturira u svoja dva komplementarna lanca. Disocijacija se postiže na visokim temperaturama. Denaturirana DNA će ostati u jednolančanom stanju kada se nakon denaturacije brzo ohladi na sobnu temperaturu. Nakon toga se stavlja na temperaturu između 25 i 30°C ispod točke denaturacije i komplementarni lanci će se ponovo asocirati i formirati dvolančanu molekulu koja je vrlo slična, ako ne i identična nativnoj DNA (Marmur i Doty, 1961.)

Hibridizacija DNA heterolognih lanaca se koristi za određivanje srodnosti DNA među bakterijama. Denaturirana DNA iz jedne bakterije se inkubira s denaturiranom DNA ili RNA druge bakterije i stvaraju se heterodupleksi između homolognih sekvenci.

Za hibridizaciju nisu potrebne potpuno homologne sekvence. Stupanj potrebne komplementarnosti za stvaranje heterodupleksa se može regulirati ekperimentalno mijenjanjem temperature inkubacije ili koncentracije soli. Povišenje inkubacijske temperature i smanjivanje koncentracije soli u inkubacijskoj smjesi povećava striktnost formiranja heterodupleksa, tj. tolerira se manje nesparenih baza, dok snižavanje temperature i povećanje koncentracije soli smanjuje striktnost formiranja heterodupleksa. Postotak nesparenih baza unutar heterodupleksa je indikacija stupnja divergencije. Količina nesparenih baza se može aproksimirati usporedbom termalne stabilnosti heterodupleksa i termalne stabilnosti homodupleksa. To se radi postepenim povišenjem temperature i mjerenjem odvajanja lanaca. Termalna stabilnost se računa kao temperatura pri kojoj se dogodilo 50% odvajanja lanaca i označava se $T_{m(e)}$. Vrijednost ΔT_m heterodupleksa seže od 0 (za savršeno sparivanje) do oko 20°C, tako da svaki stupanj nestabilnosti indicira otprilike 1% divergencije. Kako srodnost DNA između dvije vrste opada divergencija raste.

Nekoliko različitih DNA-DNA i DNA-RNA hibridizacijskih metoda se koriste za određivanje srodnosti između bakterija. Trenutno se najviše koriste reasocijacija u otopini uz odvajanje jednolančane i dvolančane DNA na hidroksiapatitu (Brenner et al., 1982.) i S1-endonukleazna metoda (Crosa et al., 1980.). Iz brojnih eksperimenata taksonomisti su formulirali filogenetsku definiciju vrste (genomovrste) kao „vrste s otprilike 70% ili više DNA-DNA srodnosti i s 5°C ili manje ΔT_m“. Srodnost DNA daje definiciju vrste koja nije podložna fenotipskim varijacijama, mutacijama ili varijacijama u metaboličkim ili drugim plazmidima. Glavna prednost srodnosti DNA je to što mjeri ukupnu srodnost tako da je

utjecaj atipičnih biokemijskih reakcija, mutacija i plazmida minimalan budući da utječe na vrlo malen postotak ukupne DNA.

Glavni sastojci hibridizacijskog pufera su jednovalentni kationi koji se dodaju u obliku soli i puferski sistem. Hibridizacija zahtijeva pH blizu neutralnom. Jednovalentni kationi su bitni za brzinu formiranja hibrida i stabilnost nastalih dupleksa.

3. DIZAJNIRANJE PROBA ZA ODREĐIVANJE KOLIČINE HIBRIDIZACIJE

Razvoj novih proba nukleinskih kiselina za identifikaciju željene bakterije se može postići na dva načina. Prvi se primjenjuje ukoliko nemamo prethodno znanje o ciljnoj nukleinskoj kiselini i naziva se empirijski odabir proba, drugi je ciljni način i zove se racionalni dizajn proba.

3.1 BAZE PODATAKA SEKVENCI NUKLEINSKIH KISELINA

Na internetu postoji nekoliko velikih baza podataka sekvenci nukleinskih kiselina. Idealna početna točka za dizajn 16S rRNA ciljanih oligonukleotidnih proba su baze podataka Ribosomal Database Project (Maidak et al.. 1999.) ili University of Antwerp (Van de Peer et al., 1999.). Obje baze podataka su sakupile više od 16 000 sekvenci malih podjedinica rRNA molekula.

3.2. EMPIRIJSKI ODABIR PROBA

Vrlo jednostavan oblik hibridizacije je kada se koristi ukupna kromosomska DNA soja nakon radioaktivnog ili neradioaktivnog obilježavanja kao proba za pretraživanje ukupne DNA. Takav način se naziva Probe čitave stanice. Genomska DNA se obilježava fotobiotinom i hibridizira s DNA referentnih sojeva koja je imobilizirana u mikrotitarskim pločicama. Ovaj način je sličan, ali puno brži od tradicionalne DNA-DNA hibridizacije u kojoj DNA mora biti izolirana iz stanice i pročišćena iz velikog broja referentnih sojeva prije podvrgavanja hibridizaciji. Probe čitave stanice su loše definirane i uvijek sadrže udio sekvenci koje su visoko konzervirane, kao što su rRNA geni.

Drugi način korištenja prirodnih nukleinskih kiselina je primjena izolirane (16S ili 23S) RNA kao hibridizacijske probe. Na internetu postoje velike baze sa sekvenciranim rRNA stoga je konstruiranje proba za DNA-rRNA hibridizaciju jednostavno.

3.3 RACIONALNI DIZAJN PROBA

Eksponencijalno raste broj sekvenci nukleinskih kiselina u raznim bazama podataka što omogućava usmjereno dizajniranje proba. Dizajn proba obično počinje odabirom ciljnog mjesta, npr. geni koji kodiraju dobro opisane faktore virulencije koji omogućavaju razlikovanje između virulentnih i nevirulentnih sojeva, specifične površinske epitope ili rezistenciju na antibiotike. Najčešće upotrebljivana ciljna molekula je 16S rRNA. Unutar stanice ima više rRNA nego ostalih vrsta RNA i sporije se degradira. Problem ove metode je to što su 16S i 23S rRNA često prekonzervativne da bi omogućile razlikovanje sojeva unutar jedne vrste ili blisko srodnih vrsta. Osim toga ne omogućuje rekonstrukciju odnosa iznad razine porodice ili reda.

3.4. OBILJEŽAVANJE OLIGONUKLEOTIDNIH PROBA

Najčešće se upotrebljava označavanje oligonukleotida inkorporacijom modificiranih nukleotida ili direktno dodavanje oznake na 5' kraj. Oznake mogu biti dodane enzimatski ili kemijski. T4 polinukleotid kinaza katalizira obilježavanje oligonukleotida s ^{32}P ili ^{33}P na 5' kraju pomoću γ-obilježenog nukleotid trifosfata. Terminalna transferaza može se koristiti za elongaciju 3' kraja obilježenim nukleotid trifosfatima. Kemijsko obilježavanje oligonukleotida postiže se inkorporiranjem alifatskih amino skupina. Koristi se i dodavanje aktiviranih molekula fluorescentnih boja npr. fluorescina ili rodamina pomoću 5' aminolinkera, ili kovalentno obilježavanje enzimima npr. alkalnom fosfatazom ili peroksidazom iz konjske repe.

4. OBLICI HIBRIDIZACIJE OLIGONUKLEOTIDIMA

4.1. DOT-BLOT/SLOT-BLOT I DRUGI OBLICI HIBRIDIZACIJE NA MEMBRANI

Ovi eksperimenti su bazirani na imobilizaciji ciljnih nukleinskih kiselina koje su ekstrahirane iz uzoraka od interesa. Ključni koraci ovih eksperimenata su liza stanica, pročišćavanje nukleinskih kiselina, denaturacija i imobilizacija ciljnih nukleinskih kiselina na nitrocelulozu ili najlonsku membranu.

4.1.1. KVANTITATIVNA SLOT-BLOT HIBRIDIZACIJA

Dot-blot i slot-blot se odnose na tehniku korištenja vakuum komore s okruglim (dot) ili longitudinalnim (slot) rupama za definiranu aplikaciju otopina ciljnih nukleinskih kiselina na membrani. Blotting ravnomjerno imobilizira svaku ciljnu nukleinsku kiselinu na jednako, definirano područje što olakšava kvantifikaciju.

Kvantitativna slot blot hibridizacija s rRNA-ciljanim oligonukleotidnim probama (Stahl et al., 1988.) je razvijena da bi se mogli proučavati različiti uzorci bez potrebe za prethodnim kultiviranjem ciljne populacije. Upotreba rRNA kao ciljne molekule omogućava korištenje vrlo razornih metoda za lizu stanice koje bi oštetile DNA. Liza se izvodi pomoću cirkonskih zrnaca pri niskom pH, u prisutnosti ekvilibriranog fenola i natrij dodecilsulfata da bi se smanjila degradacija nukleinskih kiselina. Nukleinske kiseline se pročišćavaju uzastopnom ekstrakcijom fenol/kloroformom i kloroformom koju slijedi precipitacija etanolom. Nakon spektrofotometrijske kvantifikacije RNA se denaturira s 2% glutaraldehidom i nanosi na na najlonsku membranu slot-blot aparatom. Za daljnju imobilizaciju nukleinskih kiselina koriste se sušenje zrakom i pečenje. Membrane se prehibridiziraju u puferu koji sadrži Denhardtovu otopinu (Denhardt, 1966.) prije nanošenja sintetičke oligonukleotidne probe obilježene s ^{32}P na 5' kraju (polinukleotid kinaza nanosi [γ-^{32}P]ATP). Denhardtova otopina zasićuje vezna mjesta slobodnih nukleinskih kiselina na membrani koje bi inače nespecifično vezale obilježene probe. Nakon inkubacije i ispiranja membrana mjeri se količina radioktivnosti vezana na mambranu pomoću vizualizacije fosforom ili autoradiografije kombinirane s denzitometrijom.

4.1.2. HIBRIDIZACIJA KOLONIJA

Kod hibridizacije kolonija (Grunstein i Hognes, 1975.) nukleinske kiseline se ispuštaju direktno na filtere na kojem su kolonije rasle ili su prenešene replica plate-om ili filtracijom.

4.2. REVERZNA HIBRIDIZACIJA

Kod reverzne hibridizacije označene ciljne nukleinske kiseline se analiziraju korištenjem niza imobiliziranih proba. Za razliku od standardnih hibridizacija, umjesto ciljne probe nukleinske kiseline, nekoliko proba nukleinskih kiselina se nanosi ili sintetizira na podlogu. Nakon toga uzorak od interesa, a ne proba, je označen i hibridiziran na niz. Podloge za imobilizaciju proba sežu od najlonskih membrana do mikrotitarskih pločica i oligonukleotidnih mikročipova.

4.3. IN SITU HIBRIDIZACIJA

In situ hibridizacija (općenito) je lokalizacijska tehnika koja identificira nukleinske kiseline u stanicama koje ostaju na mjestu na kojem žive. Mikrobiolozi taj termin koriste da bi opisali detekciju ciljnih nukleinskih kiselina unutar fiksiranih cijelih stanica. Ribosomska RNA nije jedini cilj za *in situ* hibridizaciju, ali je najčešći. U principu svi koraci koji se koriste za detekciju ekstrahiranih ciljnih nukleinskih kiselina primjenjuju se i za *in situ* hibridizaciju, ali za nju su potrebni i neki dodatni koraci.

Preduvjet za uspješnu *in situ* hibridizaciju je da molekule proba mogu doći do ciljnih molekula. Da bi se to postiglo stanični zid, membrane i kapsida, ukoliko je prisutna, moraju biti permeabilni za molekule probe. Probe su iz tog razloga oligonukleotidi, a fluorescentne oznake su male molekule s molekularnom veličinom ispod 1kDa. Netaknute membrane su nepermeabilne za standardne oligonukleotide tako da se provodi fiksacija stanica tretmanom otopine aldehida koji se unakrsno povezuju (paraformaldehid, formalin) i/ili denaturirajućim alkoholima. Taj korak ubija stanice.

Budući da u stanicama prilikom *in situ* hibridizacije ciljne rRNA molekule nisu potpuno jednolančane i različita ciljna mjesta nisu jednako lako pristupačna za različite probe

nukleinskih kiselina mora se pripaziti na izbor ciljnih mjesta koja će dati jak fluorescentni signal.

5. DNA FINGERPRINTING

5.1. DNA FINGERPRINTING KORISTEĆI PROBU I ELEKTROFOREZU NA AGAROZNOM GELU

DNA se tretira restrikcijskim endonukleazama da bi se dobilo što više manjih fragmenata različite molekularne veličine. Fragmenti se razdvajaju na agaroznom gelu prema molekularnoj veličini. Gel se tretira alkalima da bi pretvorili dvolančane DNA fragmente u jednolančane. Uzorak DNA fragmenta se prenosi na nitroceluloznu membranu i dodaje se označena proba koja se veže samo na fragmente koji sadrže komplementarnu sekvencu. Nakon uklanjanja nevezane probe, lokacija vezane probe se određuje prekrivanjem membrane fotografskim filmom koji se izlaže radijaciji ili kemiluminiscenciji.

5.2. RIBOTIPIRANJE

Ribotipiranje je varijacija DNA *fingerprinting*-a u kojem je DNA proba koja se nanosi na membranu komplementarna genima za rRNA. Operon koji kodira za rRNA je *rrn* i on se ponavlja 2-14 puta po genomu, ovisno o vrsti. Ova metoda se oslanja na to da sekvenca DNA između *rrn* operona varira od soja do soja i zbog toga će varirati mjesta cijepanja DNA restrikcijskom endonukleazom.

5.3. DNA FINGERPRINTING KORIŠTENJEM GEL ELEKTROFOREZE U PULSNOM POLJU

U ovoj metodi se ne koristi proba. Kada se bakterijska DNA tretira restrikcijskom endonukleazom koja cijepa na malo mjesta dobije se malo velikih fragmenata od 1 000 000 parova baza naviše. Dugi fragmenti DNA se ne mogu razdvajati na uobičajenom agaroznom gelu kao kratki fragmenti nego se polako pomiču kroz matriks kao da prolaze kroz usku cijev koja zavija. Svi migriraju sličnom stopom prema katodi i zbog toga se ne može dobiti uzorak vrpci na gelu koji bi mogli koristiti za karakterizaciju bakterijskog soja. Ukoliko se smjer električnog polja naglo promjeni ti fragmenti DNA se moraju reorjentirati prema novom smjeru prije nego mogu nastaviti migraciju kroz gel. Što je veća molekularna veličina

fragmenata to im dulje treba da se reorjentiraju i time im dulje treba da bi migrirali kroz gel. Oprema za gel elektroforezu u pulsnom polju uzrokuje periodičke promjene smjera električnog polja i tako omogućava dobro razdvajanje velikih fragmenata i formiranje izraženih vrpci. Vrpce se mogu vizualizirati uranjanjem gela u otopinu etidijevog bromida koji se veže na fragmente i fluorescira pod ultraljubičastim svjetlom. Problem s ovom metodom je to što DNA mora biti jako nježno tretirana da bi se izbjegli nasumični mehanički lomovi. Zbog toga se netaknute bakterijske stanice usađuju u male blokove agaroze s niskom temperaturom topljenja i liziraju *in situ* prije tretiranja restrikcijskom endonukleazom. Blokovi se nakon toga postavljaju u ploču gela i podvrgavaju gel elektroforezi u pulsnom polju pri niskoj temperaturi.

5.4. KLASIFICIRANJE SOJEVA POMOĆU NASUMIČNO POJAČANE POLIMORFNE DNA

Klasificiranje sojeva pomoću nasumično pojačane polimorfne DNA se bazira na PCR tehnici i korištenju jednog primera od 10 baza. Budući da je primer kratak obično postoji puno komplementarnih sekvenci na genomskoj DNA za koju će se primer vezati. DNA polimeraza dodaje druge baze na primer i stvara kratke dijelove dvolančane DNA. PCR tehnikom se tada stvaraju milijuni kopija tih dvolančanih dijelova DNA. DNA dijelovi različite veličine se tada razdvajaju elektroforezom na agaroznom gelu i vizualiziraju bojanjem etidijevim bromidom.

6. LITERATURA

Don J. Brenner, Noel R. Krieg, James T. Stanley, George M. Garrity, 2005., Bergey's manual of Systematic Bacteriology, 2. Edition:

1. Don J. Brenner, James T. Stanley and Noel R. Krieg, Classification of Procaryotic Organisms and the Concept of Bacterial Speciation, 27-32.

2. Noel R. Krieg, Identification of Procaryotes 33-38.

3. Rudolf Amann and Karl-Heinz Schleifer, Nucleic Acid probes and Their Application in Enviromental Microbiology, 67-82.

7. SAŽETAK

Molekularne metode klasifikacije bakterija su brojne. Svim metodama je zajedničko to što uključuju hibridizaciju nukleinskih kiselina soja kojeg istražujemo s drugim, dobro poznatim sojem, kako bismo odredili stupanj srodnosti. Nakon određivanja stupnja srodnosti, prema stupnju hibridizacije, bakterije možemo smjestiti u taksonomske stupnjeve. Osnovne metode klasifikacije bakterija su hibridizacija DNA-DNA, hibridizacija DNA-rRNA, hibridizacija oligonukleotidima i DNA fingerprinting.

U ovom radu izložene su osnovne metode klasifikacije s naglaskom na izvođenje i razlike u metodama izvođenja eksperimenata.

8. ABSTRACT

Several molecular methods are applied for the classification of bacteria. These methods are based on nucleic acid hybridization of an unknown bacterial strain of interest with that of a closely related already identified strain to determine the degree of genetic complementarity. The degree of hybridization, proportional to the degree of similarity is used to establish taxonomic identification. The broadly used techniques in bacterial taxonomy are DNA-DNA hybridization, DNA-rRNA hybridization, oligonucleotide hybridization and DNA fingerprinting.

Here are described some of the most fundamental techniques used in bacterial classification with an emphasis on methodological issues and differences between experimental approaches.