

PODLE MĚ JE NEJLEPŠÍ DOJNICE STÁT.

Hybridizace a její využití v mikrobiologii

doc. RNDr. Milan Bartoš, Ph.D.

bartosm@vfu.cz

Přírodovědecká fakulta MU, 2012

Obsah přednášky

- 1) Způsoby provedení hybridizace**
- 2) Hybridizace v roztoku**
- 3) Příprava značených sond**
- 4) Hybridizace na pevném povrchu**
- 5) Southernův přenos**
- 6) Fluorescentní *in situ* hybridizace**
- 7) Příklady využití metod hybridizace v analýze mikroorganismů – RFLP, reverzní hybridizace, spoligotypizace**



Doporučená literatura

Tentokrát se musíte spolehnout na základní literaturu + odkazy na odborné publikace uvedené v přednášce

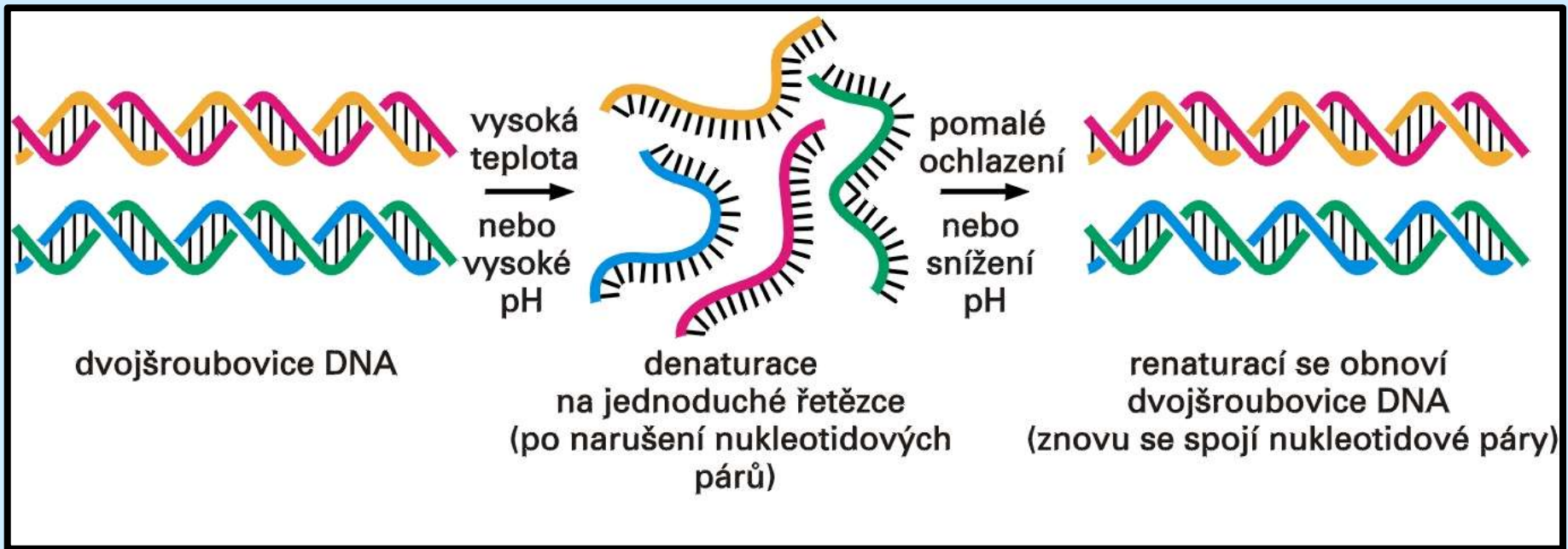
Hybridizace

- reasociace dvou jednořetězcových DNA nebo RNA, pokud mají jejich sekvence úplně nebo částečně komplementární báze



- nemyslí se jí ale spojování jednořetězců, které byly součástí téže molekuly) = renaturace

Hybridizace je založena na schopnosti NA denaturovat a renaturovat

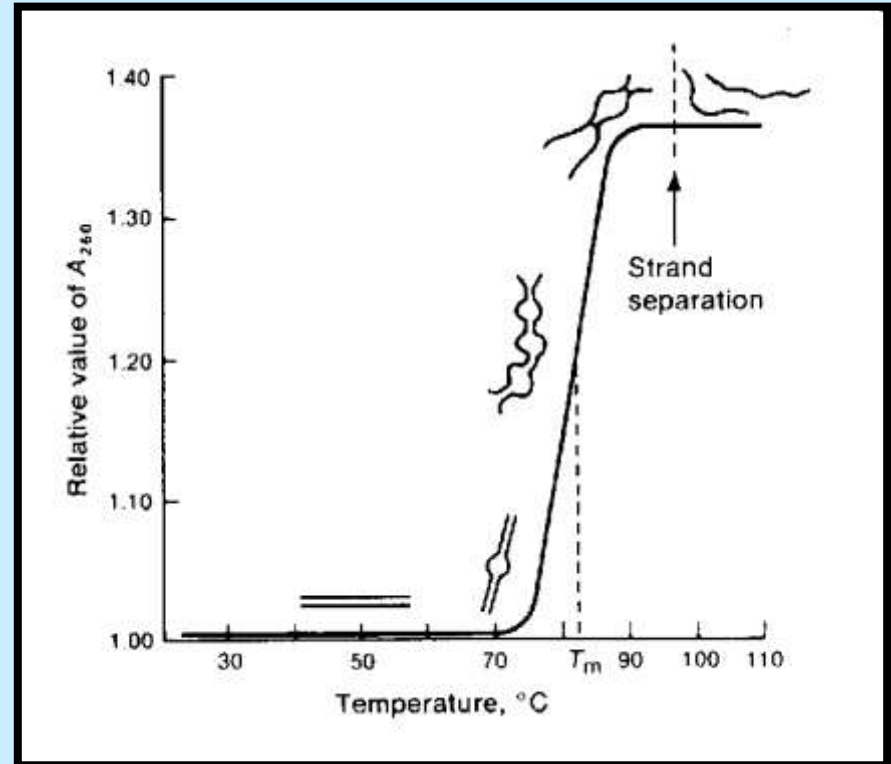


Co to je denaturace DNA

- **oddělení komplementárních vláken DNA působením vysoké teploty (90-100°C), extrémních hodnot pH nebo denaturačních činidel (formamid, močovina)**
- **Při denaturaci se zvyšuje absorpce světla při vlnové délce 260 nm (tzv. hyperchromní efekt)**
- **Je to důsledek změny v uspořádání bází**

Co to je hyperchromní efekt

- **Spojené řetězce snižují absorbanci**
- **Při denaturaci absorbance stoupá o 30-40%**
- **Řetězce drží pevně pohromadě dokud se nedosáhne T_m , pak se duplex rychle rozpadá**



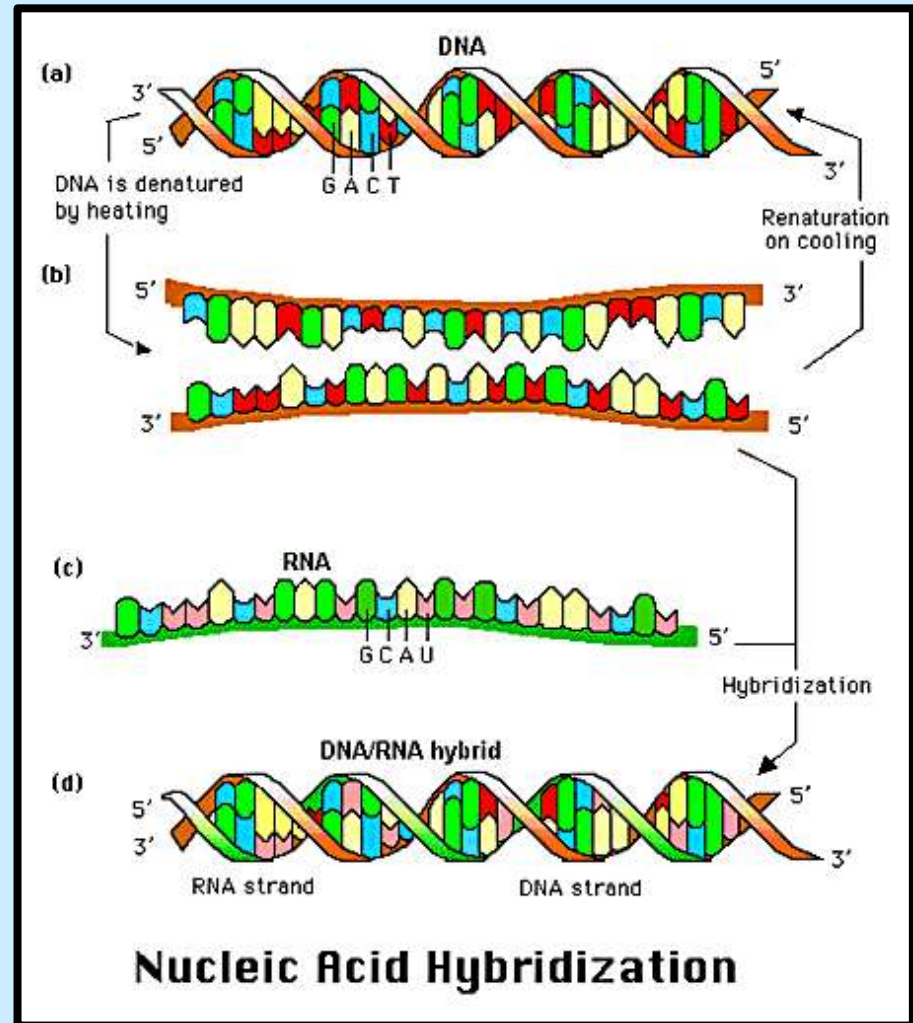
http://members.tripod.com/arnold_dion/RecDNA/Fig1-7.gif

Co to je renaturace DNA

- opětná tvorba dvouřetězcových struktur z jednořetězcových polynukleotidů za vhodných připojovacích („annealing“) podmínek
- nastává při pomalém ochlazení (65°C) roztoku teplem denaturované DNA
- nenastává při prudkém ochlazení roztoku denaturované DNA
- při renaturaci se mohou tvořit hybridní molekuly DNA/DNA, RNA/RNA i **DNA/RNA**
- rozsah renaturace odpovídá rozsahu komplementarity sekvencí

Faktory ovlivňující tvorbu hybridů

- teplota
- koncentrace solí
- stupeň komplementarity
- délka fragmentů



Využití hybridizace

- **test komplementarity sekvencí (ve směsi mnoha molekul DNA budou hybridizovat jen ty, které jsou dostatečně komplementární)**
- **detekce molekul DNA a RNA, které jsou komplementární k jakékoliv izolované nukleové kyselině**
- **vyhledávání sekvencí v genových knihovnách**
- **vyhledávání sekvencí v cytologických preparátech**
- **charakterizace sekvencí**
- **mapování genomu**
- **při polymerázové řetězové reakci**

Typy hybridizací

- hybridizace v roztoku
- hybridizace na pevném povrchu
- hybridizace *in situ* (FISH) – mapování chromozómů a specifických lokusů
- DNA, RNA arrays

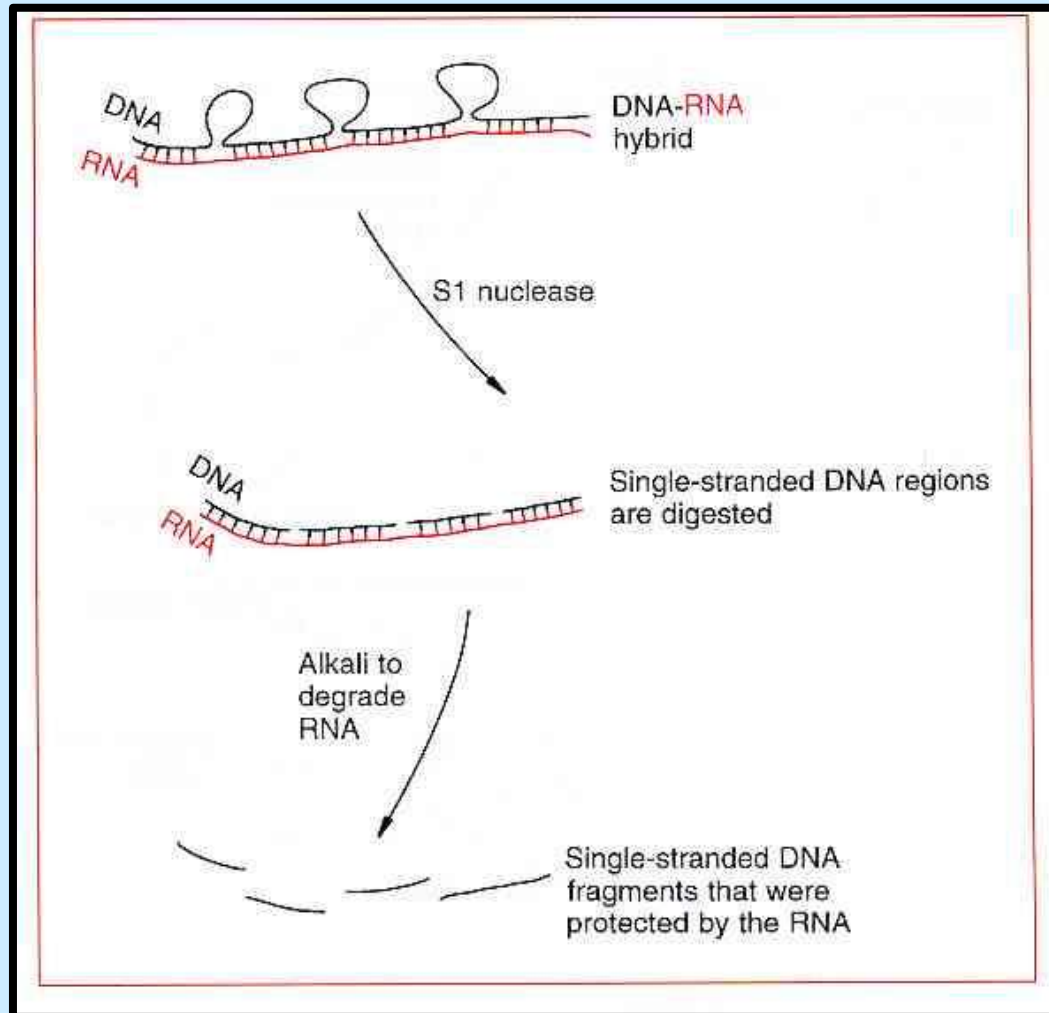
Hybridizace v roztoku

Samotná se téměř nevyužívá, většinou spojená s další detekční technikou

- **S1 mapování (detekce exonů a intronů hybridu DNA/mRNA)**
- **Denaturační gradiendová gelová elektroforéza (DGGE)**
- **Heteroduplexní analýza**

S1 mapování

Význam pro mapování složených genů





Mají bakterie složené geny?

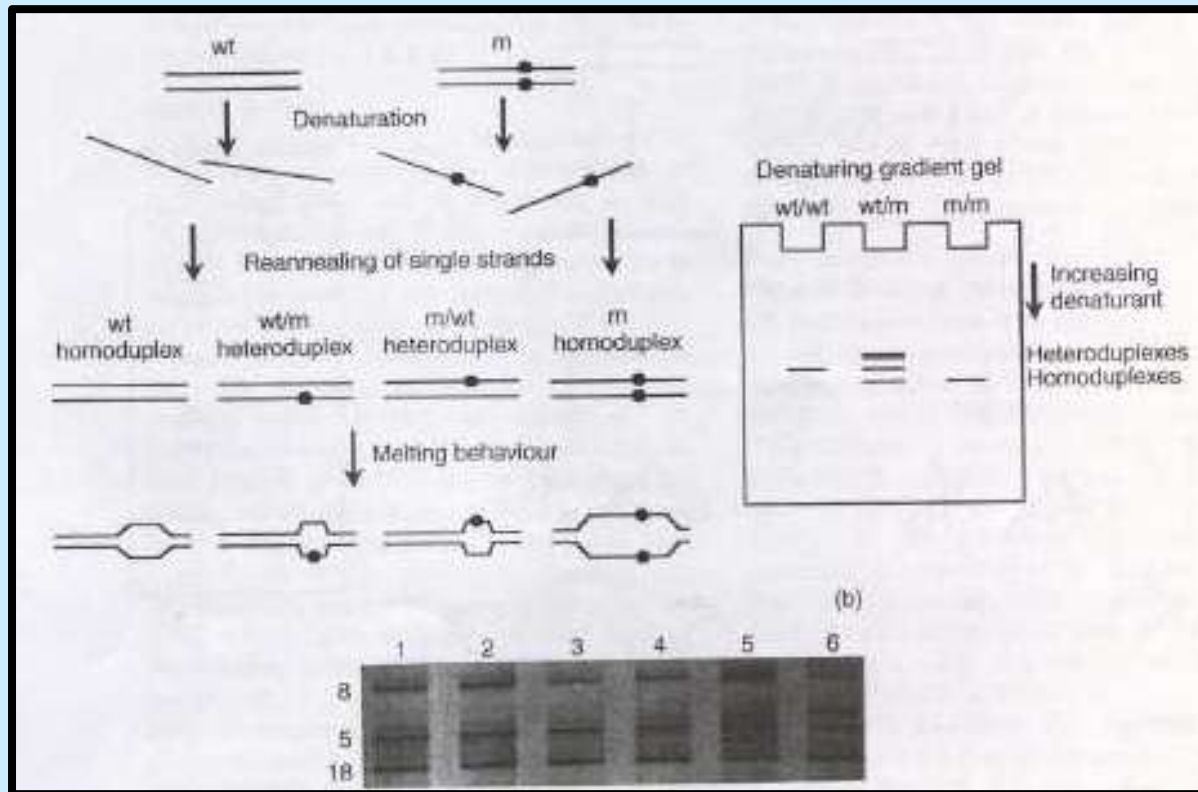
Nemůžu žádný příklad najít.

Ale naše přednáška je o mikroorganismech, nejen o bakteriích. A kvasinky složené geny mají!



DGGE

- Páry CG drží více pohromadě než páry TA



Podobně funguje TGGE

Analýza heteroduplexů

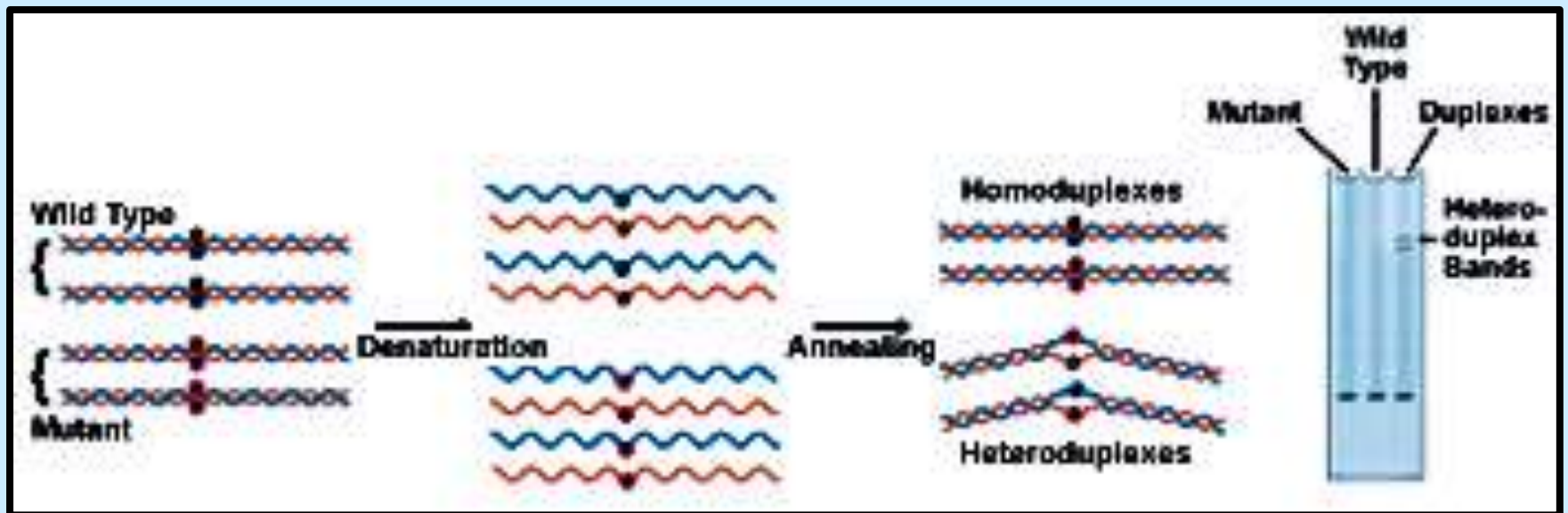
- **Molekuly dsDNA vznikají z řetězců, které pocházejí z různých zdrojů**
- **Výsledné struktury nejsou 100% komplementární, z toho plyne označení heteroduplex**
- **Obsahují smyčky a bubliny v oblastech, kde se sekvence DNA liší**
- **Struktury lze pozorovat mikroskopicky – heteroduplexní mapování**



Podívejte se na heteroduplexní mapování v základní učebnici

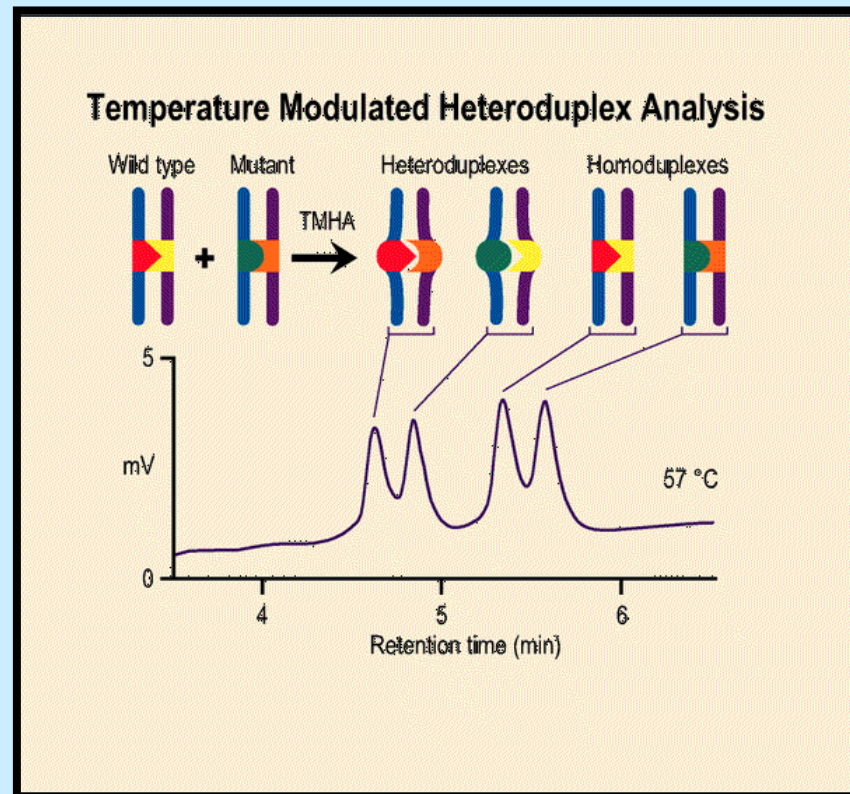
Analýza heteroduplexů

Heteroduplexy se pohybují pomaleji než homoduplexy



Analýza heteroduplexů

Homoduplexy a heteroduplexy lze rozlišit i kapilární elektroforézou



Hybridizace na pevném povrchu

- Probíhá na speciální membráně
- Vzorek se nanáší přímo na membránu = **tečková hybridizace (dot blot)**
- Vzorek se rozdělí na gelu a pak se přenese na membránu = **Southernův přenos (Southern blot)**
- Základem hybridizace je obvykle **značená sonda** o známé nukleotidové sekvenci

Blotting = přenos

- **Southern blotting (Dr. Edwin Southern) = DNA**
- **Northern blotting = RNA**
- **Western blotting = proteiny**

- **southwesternový přenos - proteiny vázající se na DNA (sondou je DNA)**
- **northwesternový přenos - proteiny vázající se na RNA (sondou je RNA)**

K čemu se využívá Southernův přenos

- **Identifikace přítomnosti genu v materiálu vůbec**
- **Identifikace genu za účelem jeho klonování**
- **Využívá se tam, kde je dostupné pouze malé množství vstupního materiálu nebo je vysoké pozadí**

Příprava hybridizačních sond

Sondy radioaktivně značené

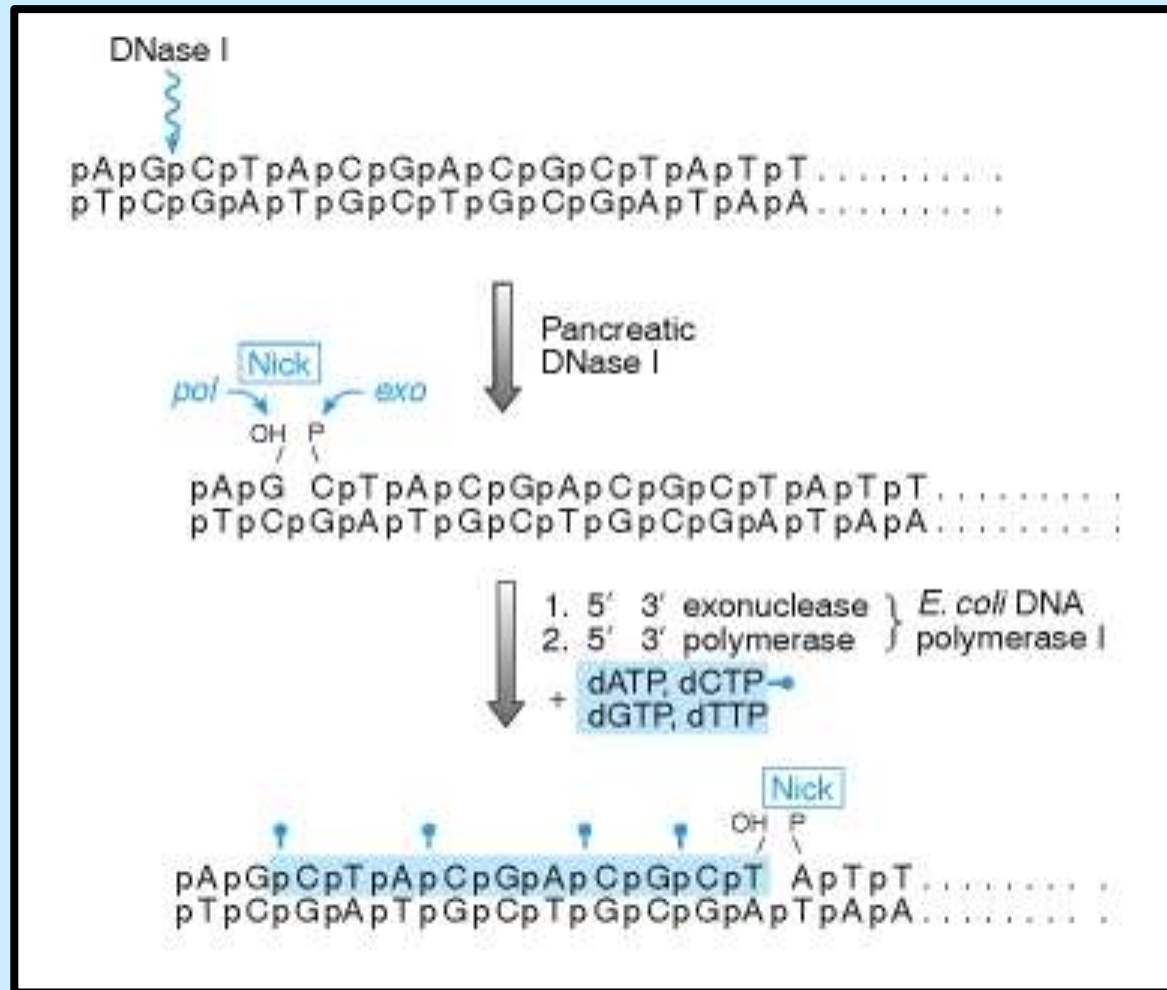
- **Nick translace**
- **Vyplnění jednořetězcových konců**
- **Nahodilé značení**
- **Zpravidla se využívá radioaktivní fosfor ^{32}P**

Sondy fluorescenčně značené

- **Značení biotinem**
- **Značení digoxigeninem**
- **Značení křenovou peroxidázou**
- **Citlivější, bezpečnější, dnes už používané častěji**

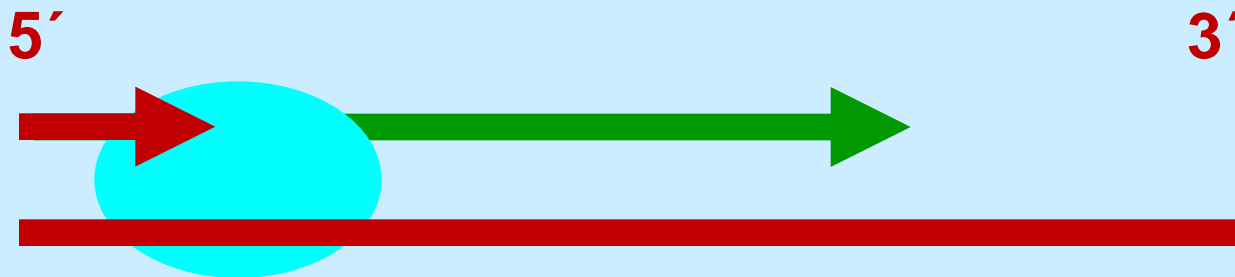
Nick translation

Posun jednořetězcového zlomu

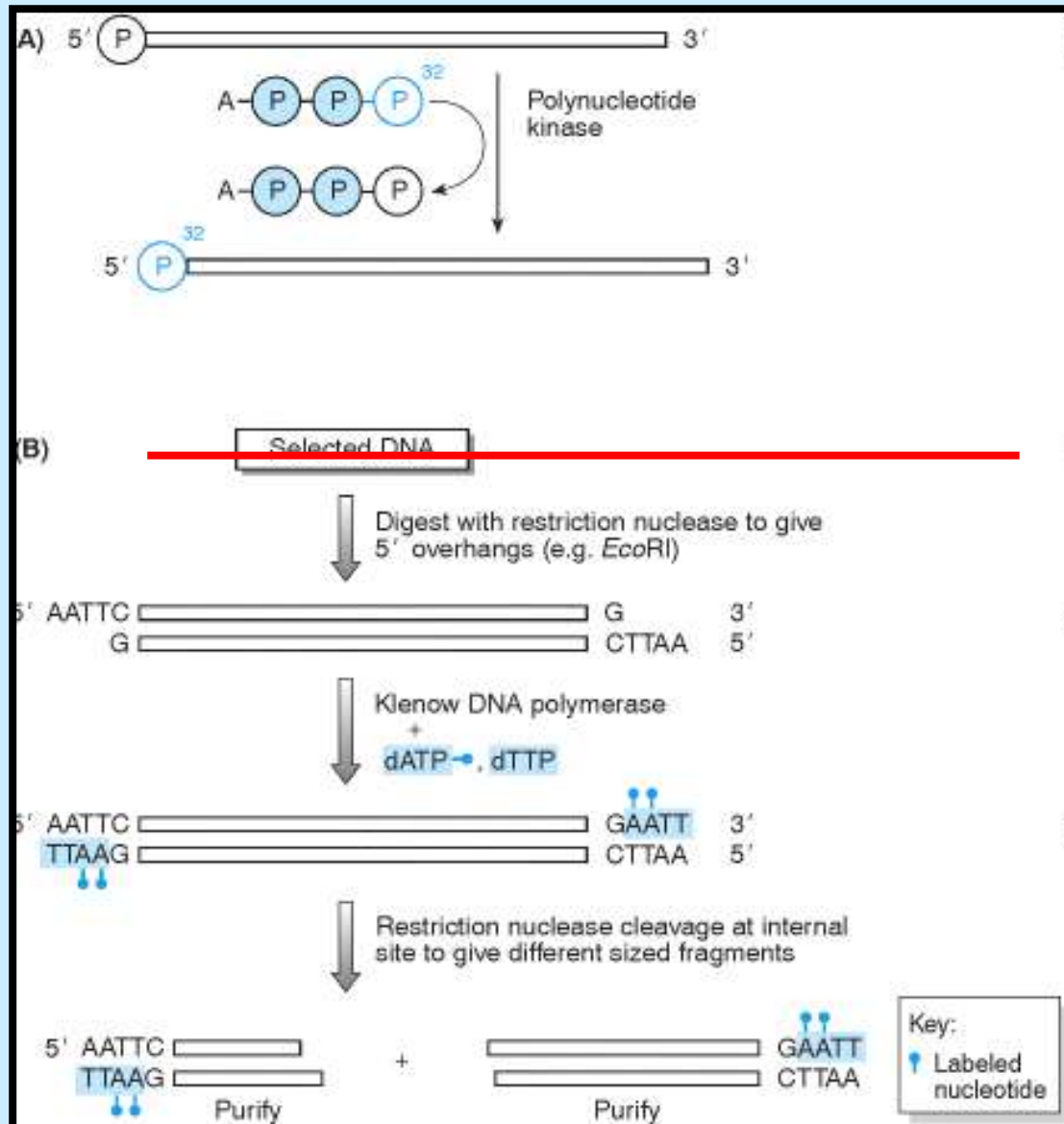


Zopakujme si: Klenowův fragment

- syntéza ve směru 5' - 3'
- exonukleázové odbourávání ve směru 3' - 5'
- tam, kde se neodbourává primer
- sekvenování, značení DNA

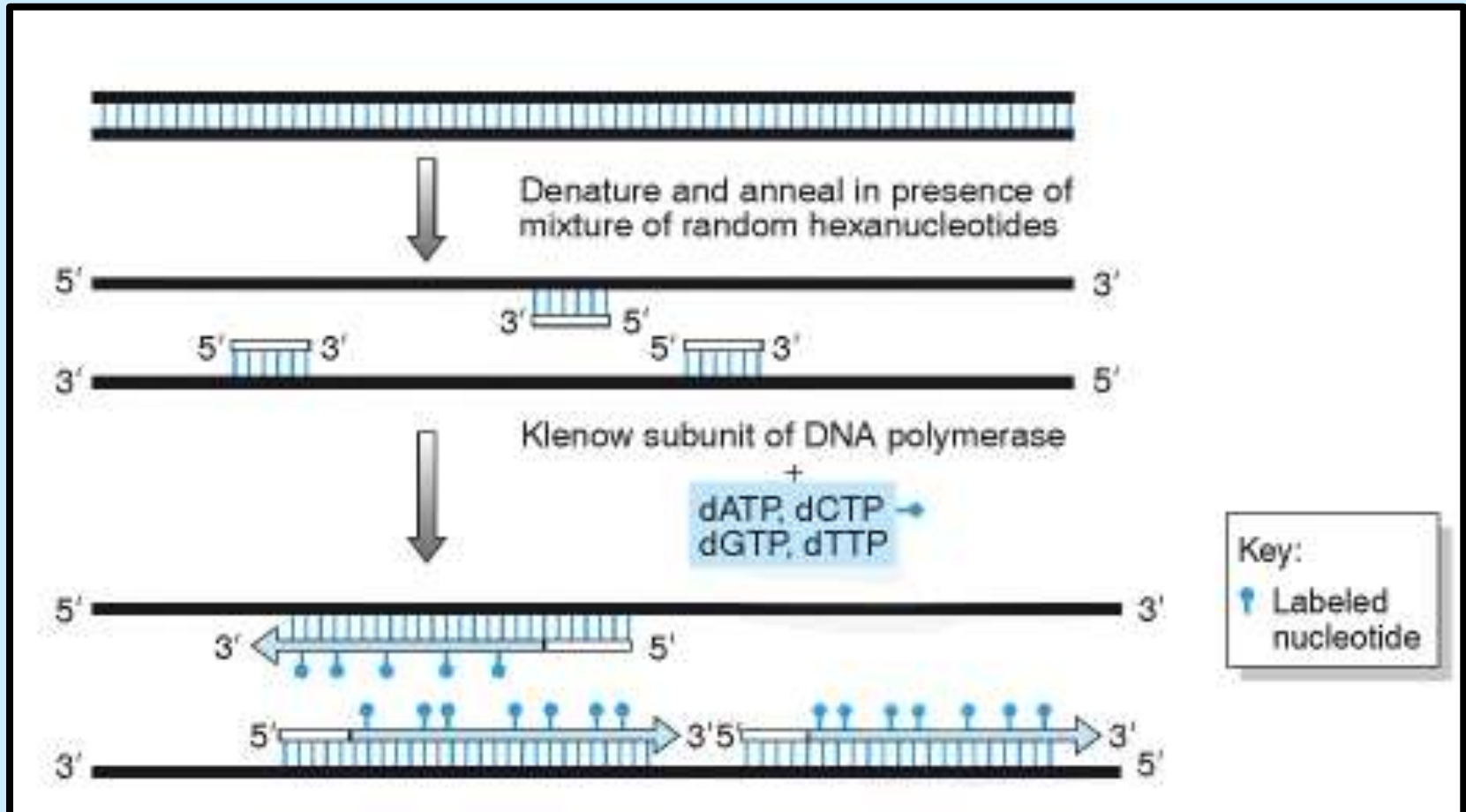


Značení konců nukleových kyselin



Nahodilé značení

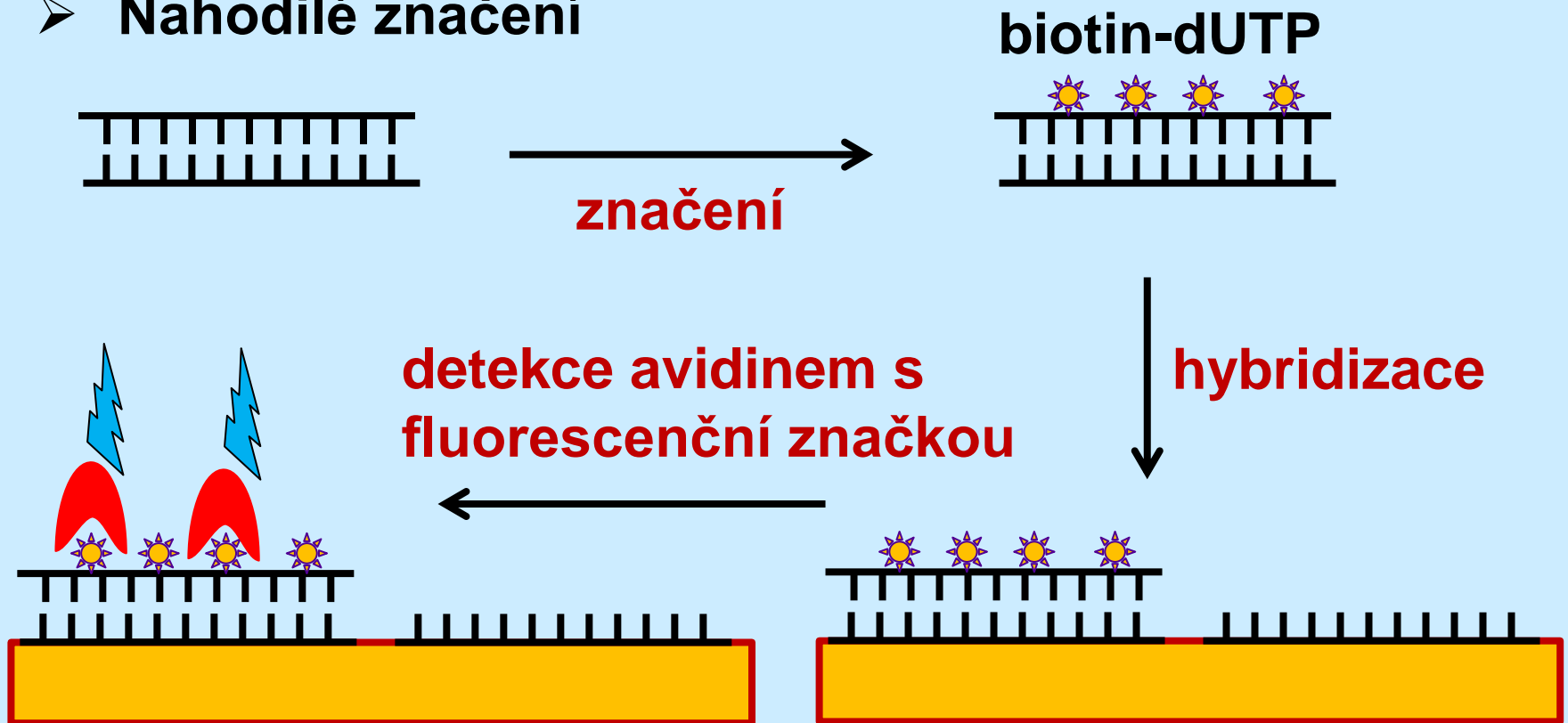
„random primer DNA labeling“ = prostřednictvím náhodných hexanukleotidů



Značení biotinem

Lze využít všech tří základních postupů

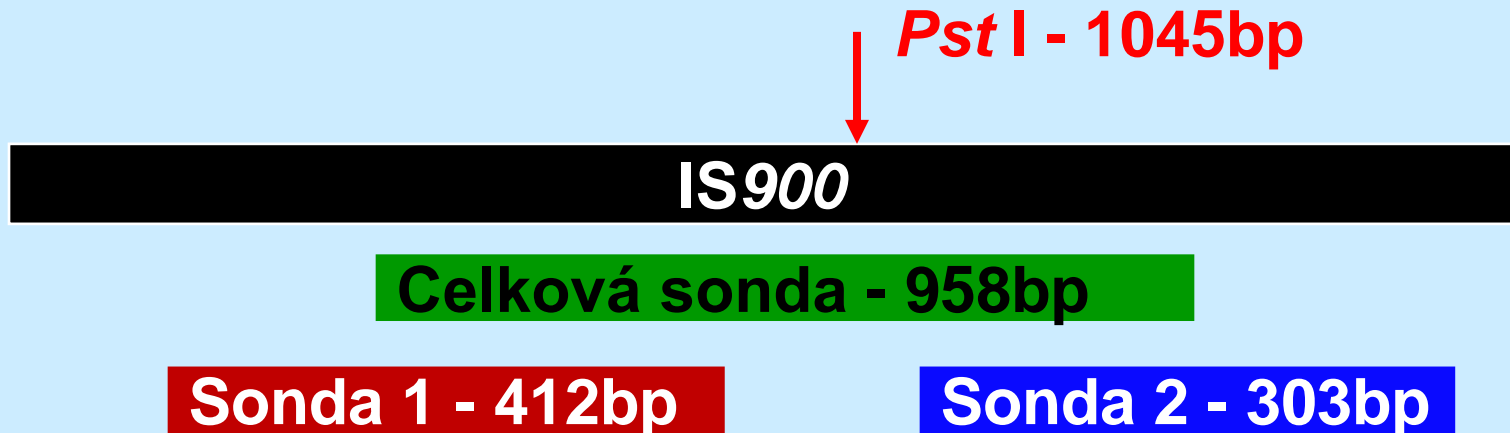
- Nick translace
- Vyplnění jednořetězcových konců
- Nahodilé značení



Praktická aplikace značení sond

Příprava sond pro diferenciaci kmenů *M. a. paratuberculosis*

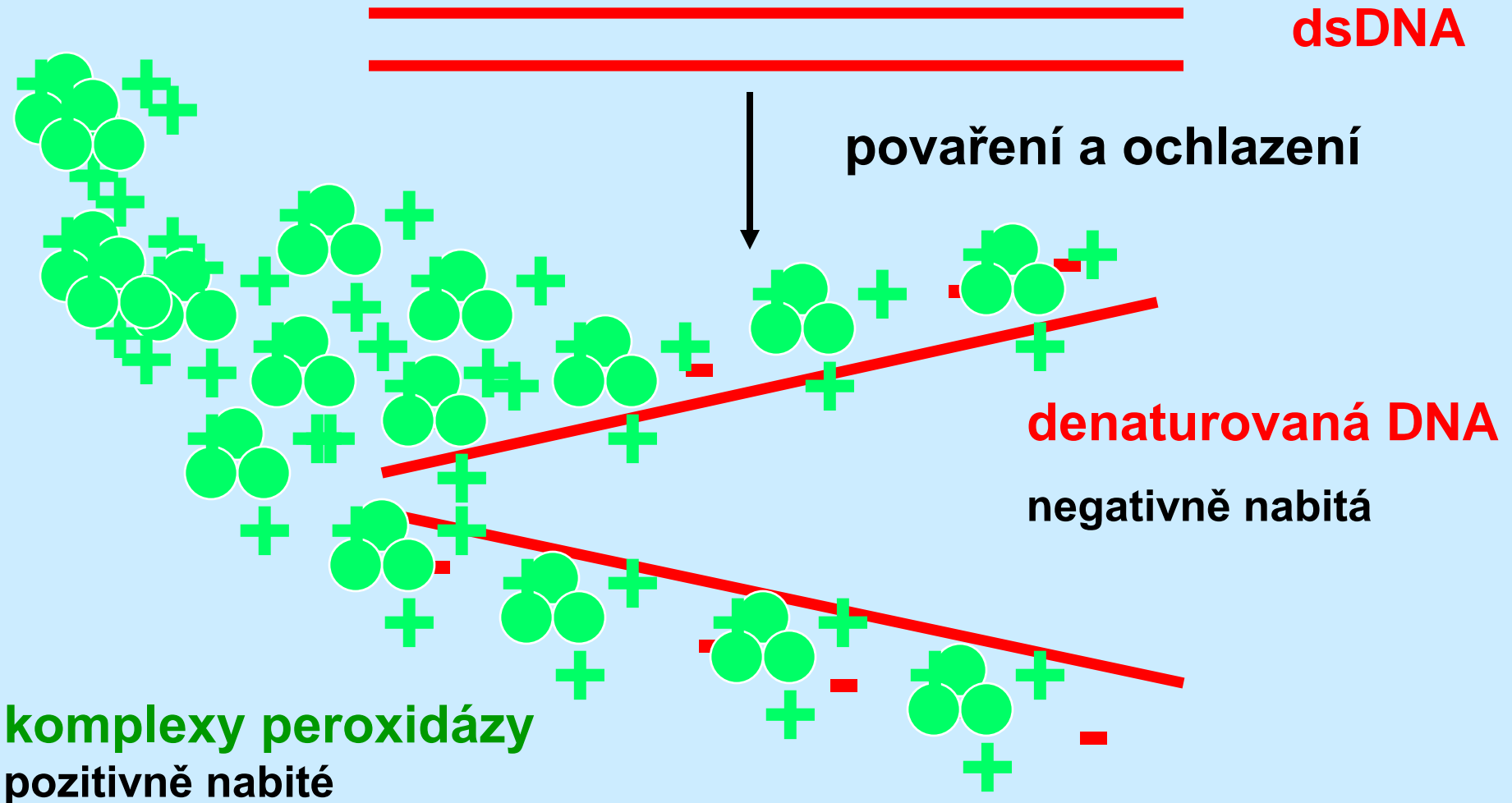
Celkem 3 sondy detekující části inzerční sekvence IS900 – inzerční sekvence specifické pro *M. a. paratuberculosis*



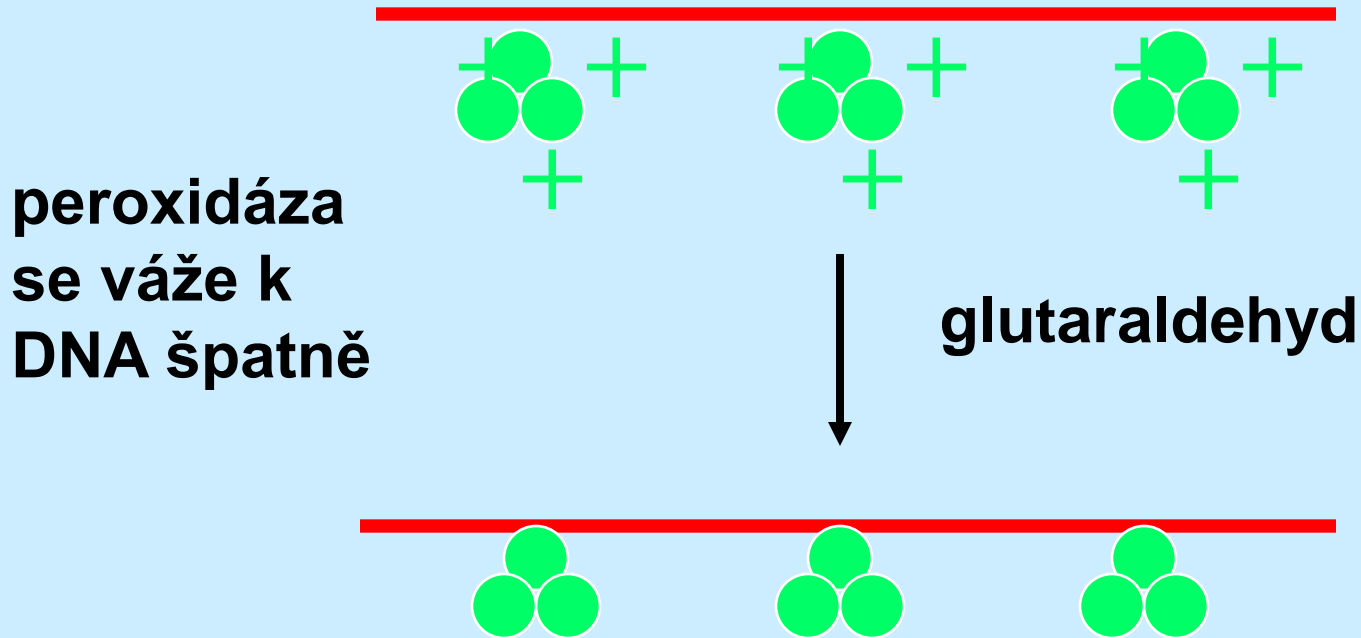
Základní kroky při přípravě sond

- **Amplifikace specifických fragmentů PCR**
- **Purifikace amplikonů**
- **Značení sond peroxidázou**
- **Kontrola koncentrace sondy**

Značení sondy



Značení sondy

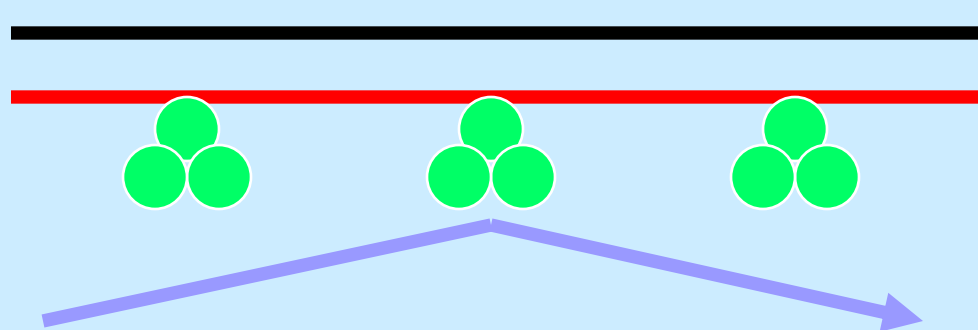


peroxidáza
se váže k
DNA špatně

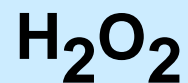
glutaraldehyd

peroxidáza se váže k DNA kovalentně

Detekce peroxidázou značené sondy



matricová DNA
značená sonda



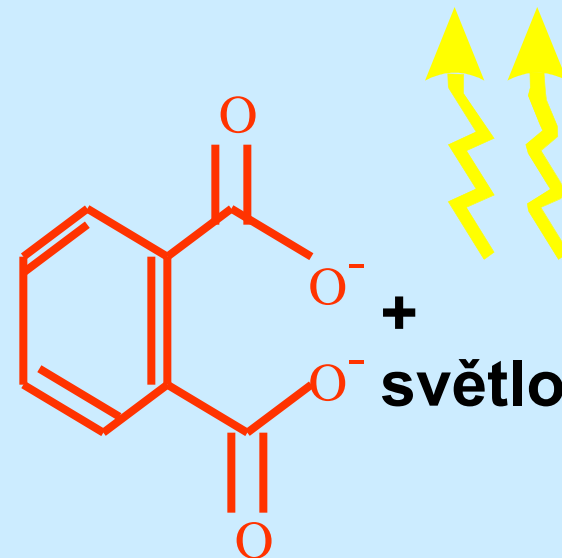
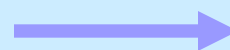
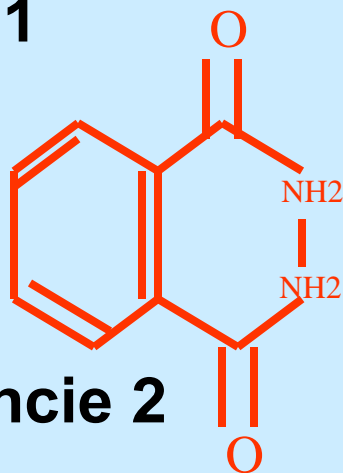
detekční reagensie 1



zesilovač

luminol

detekční reagensie 2

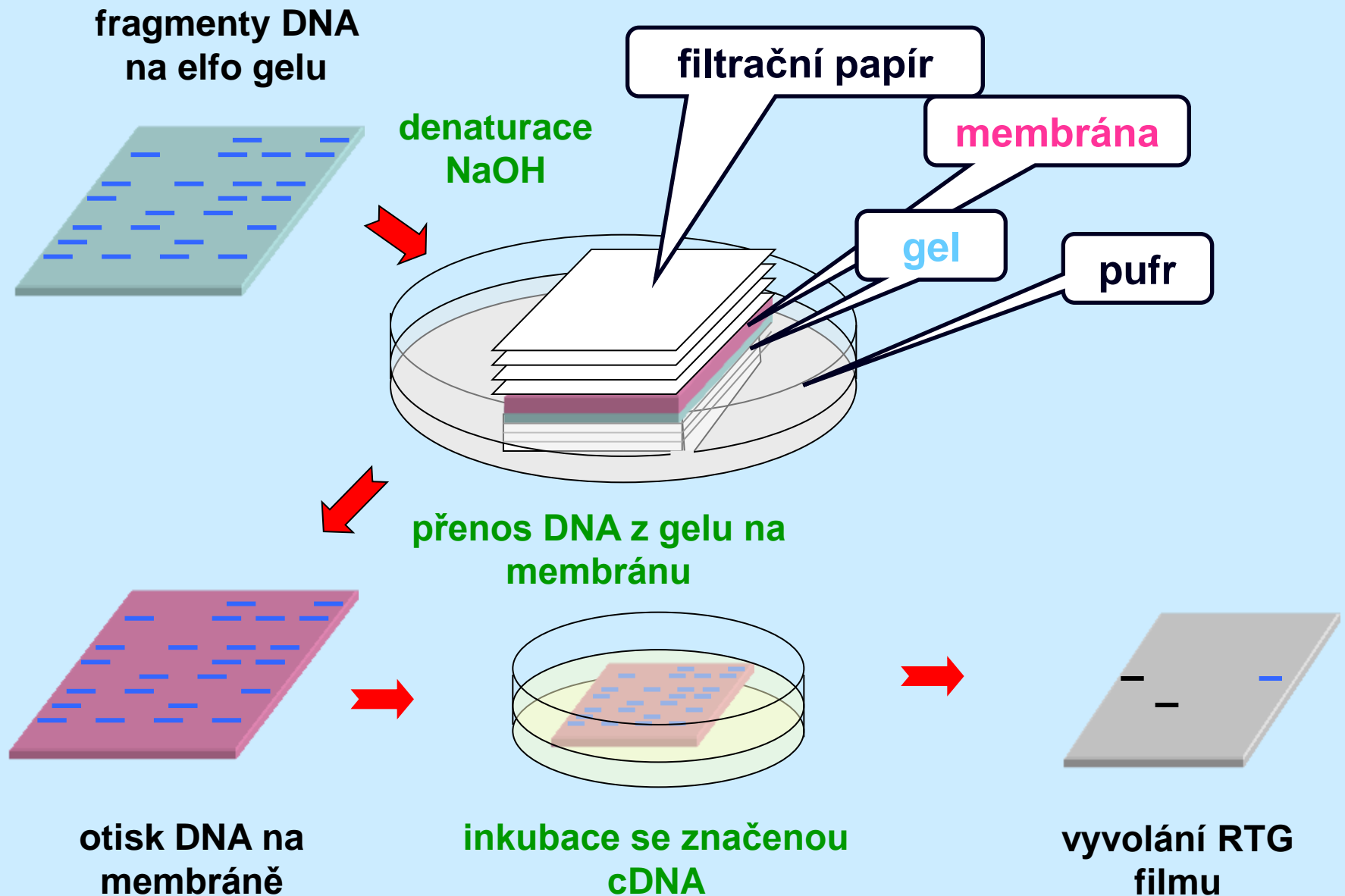


+ světlo

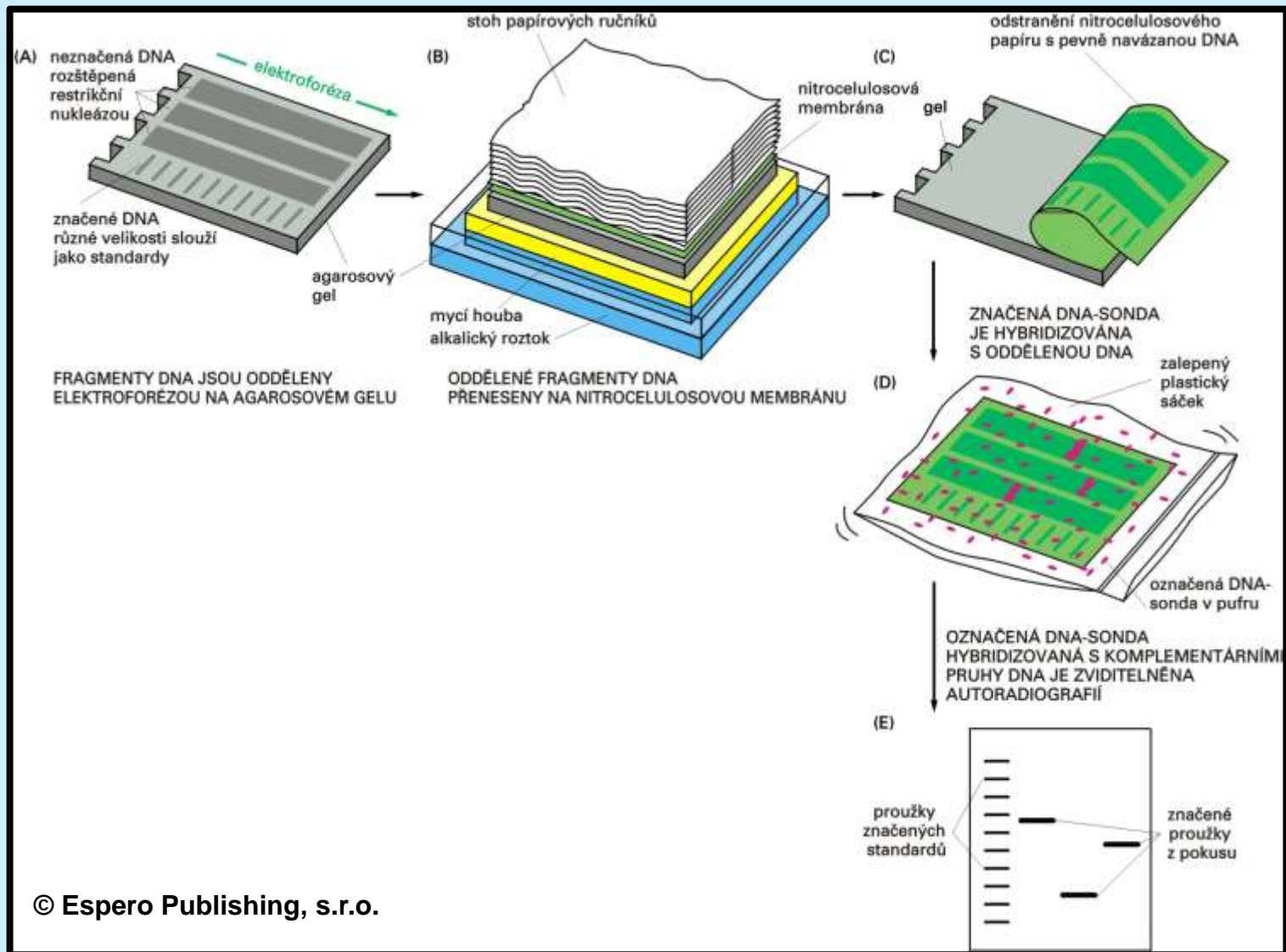
Postup při Southernově přenosu

- 1. rozdělení fragmentů DNA** daného vzorku gelovou elektroforézou
- 2. denaturace DNA a přenos** jednořetězcových fragmentů DNA **na** nylonový **filtr** („blotting“)
- 3. inkubace filtru se značenou** jednořetězcovou **sondou**: hybridizace sondy s komplementární sekvencí imobilizovanou filtru
- 4. odmytí** nenavázané sondy
- 5. detekce** navázané **sondy** - vizualizace hybridů

Southern blotting



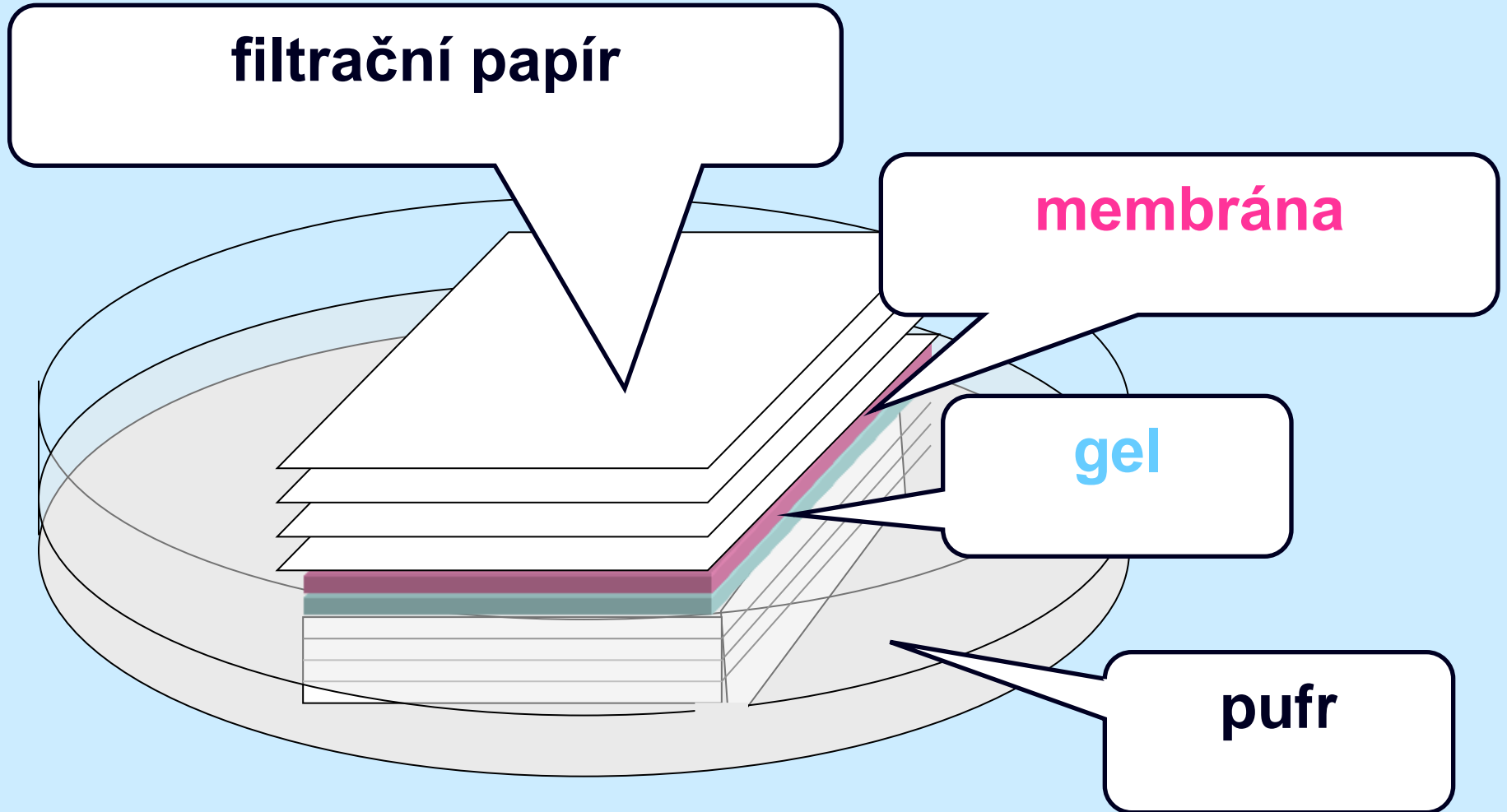
Southern blotting



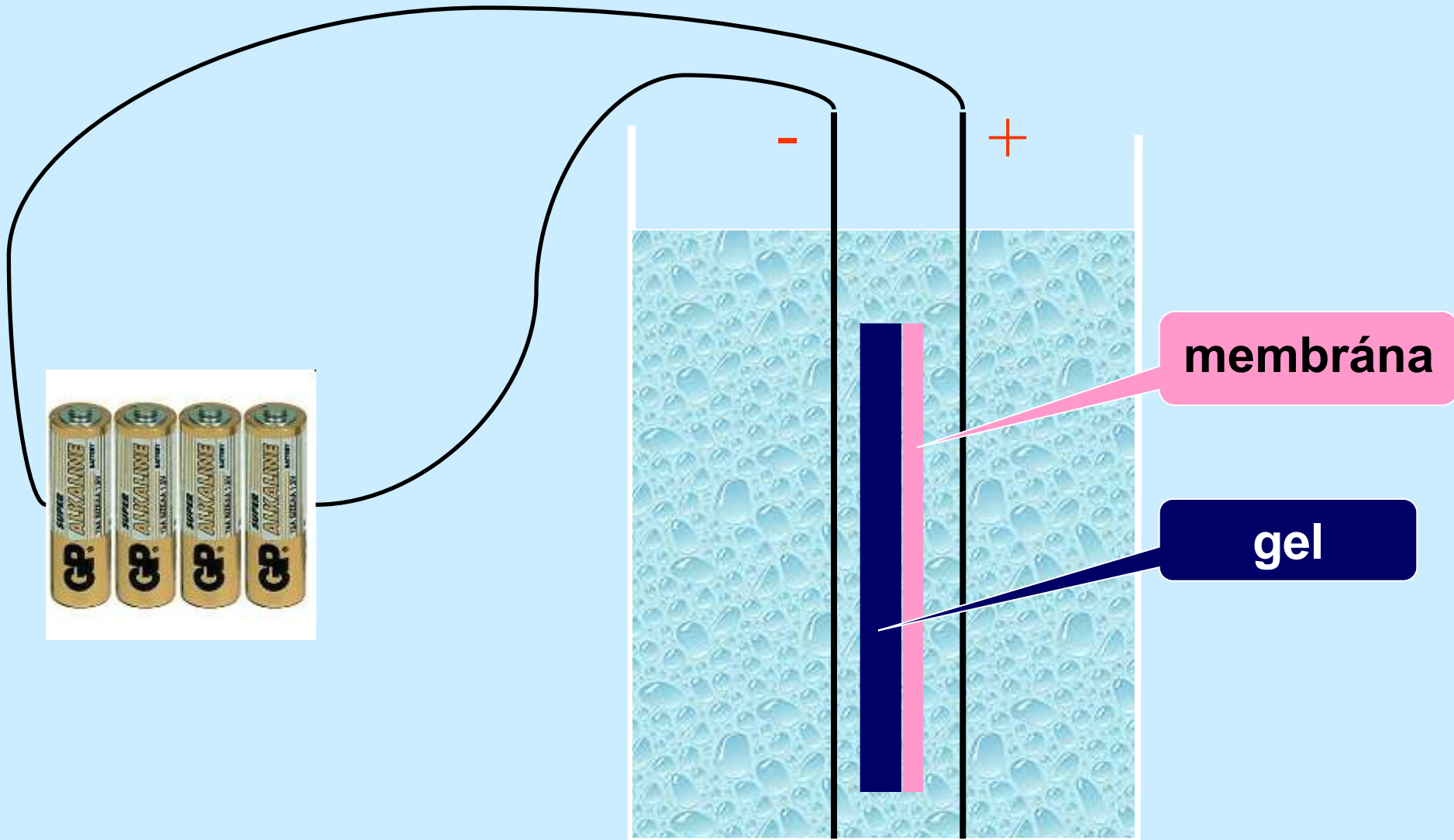
Způsoby přenosu („blottingu“)

- **kapilární přenos**
- **elektroforetický přenos**
- **vakuový přenos**

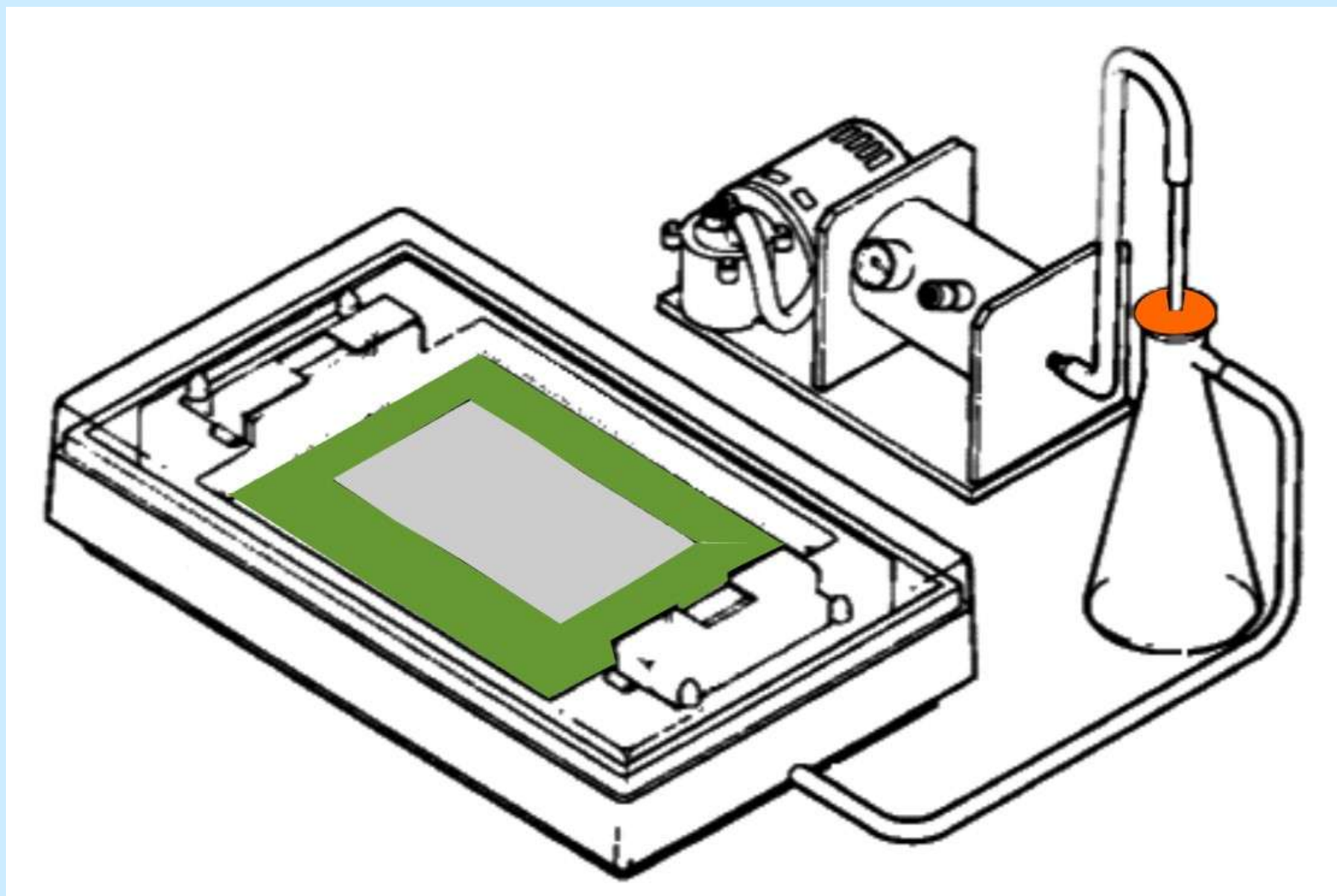
Kapilární přenos



Elektroforetický přenos



Vakuový přenos



Fluorescentní in situ hybridizace

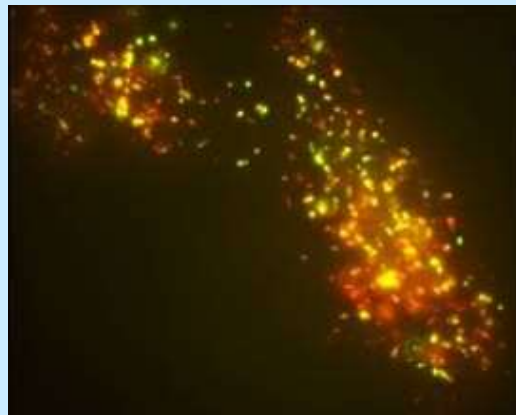
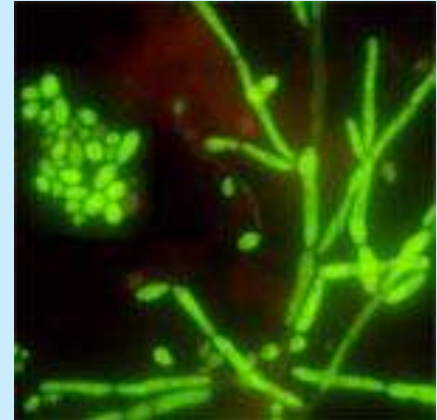
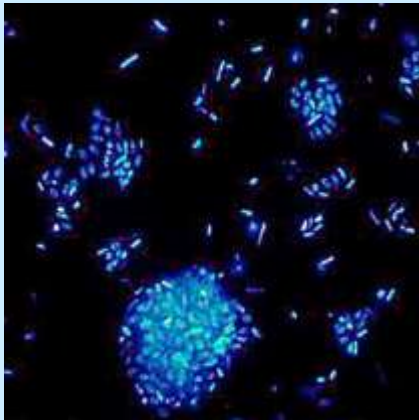
fluorescence *in situ* hybridization (FISH)

Metoda sestává ze tří základních kroků

- **Fixace vzorku na mikroskopickém sklíčku**
- **Hybridizace značené sondy k homologickým fragmentům na genomové DNA**
- **Enzymatická detekce hybridů sonda-cílová sekvence**
- **Sondy radioaktivně značené**
- **Sondy fluorescenční: rychlejší, silnější signál, simultánní diferenciaci různých cílů**

Ukázky FISH

fluorescence *in situ* hybridization



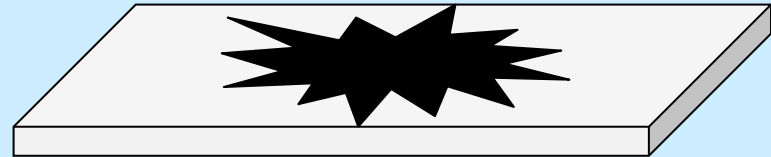
FISH v mikrobiologii

- **Umožňuje detekci i nerostoucích bakterií**
- **Sonda je druhově specifická a míří zpravidla ke genu pro 16S rRNA**
- **Metoda je vhodná pro fylogenetické, ekologické, diagnostické a environmentální studie**
- **Kombinuje preciznost molekulární biologie s mikroskopickým pozorováním**
- **Je možno pozorovat výskyt bakterií v kontextu s morfológickou charakteristikou napadené tkáně**
- **Citlivost až jediná bakterie, metodicky mimo PCR**

Typický FISH protokol

4 základní kroky

1) Fixace a permeabilizace vzorku



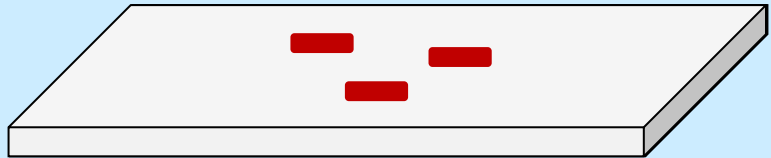
2) Hybridizace



3) Promývací kroky – odmytí nenavázané sondy



4) Detekce značených buněk mikroskopicky nebo průtokovou cytometrií



Charakteristika sond

Dlouhé 15 až 30 nukleotidů

Fluorofor	Barva	Excitace	Emise
Alexa 488	zelená	493	517
Cy3	červená	552	565
Cy5	červená	649	670
DAPI	modrá	350	456
Fluorescein	zelená	494	523
Rodamin	červená	555	580
TAMRA	červená	543	575
Texas red	červená	590	615

Zodpovězte otázku



Jak dlouhá musí být minimálně sonda, aby našla jedinou specifickou sekvenci v bakterii, jejíž genom má velikost $4,0 \times 10^6$ bp?

$$4,0 \times 10^6 = 4^x$$

$$\ln(4,0 \times 10^6) = X \ln(4)$$

$$X = \ln(4,0 \times 10^6) / \ln(4)$$

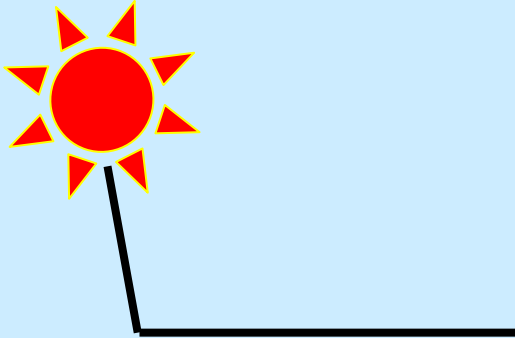
$$X = 11$$



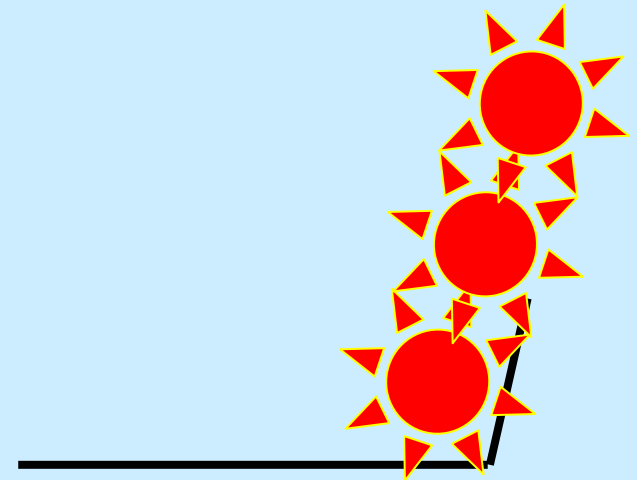
Jak označit sondu?

Přímé značení

5' - koncové značení



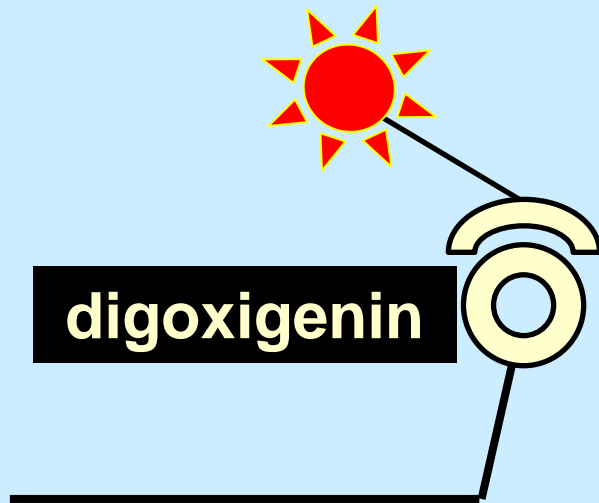
3' - koncové značení



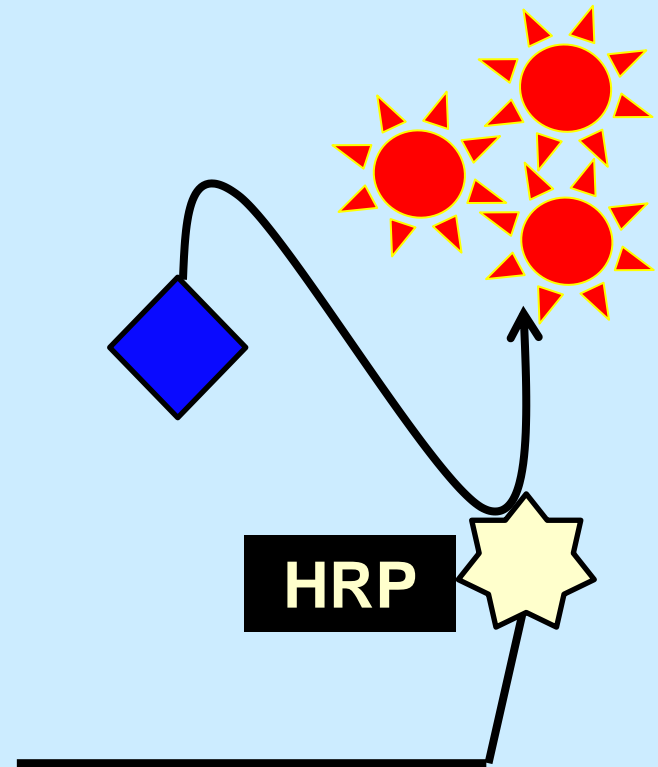
Jak označit sondu?

Nepřímé značení

Reportérová molekula

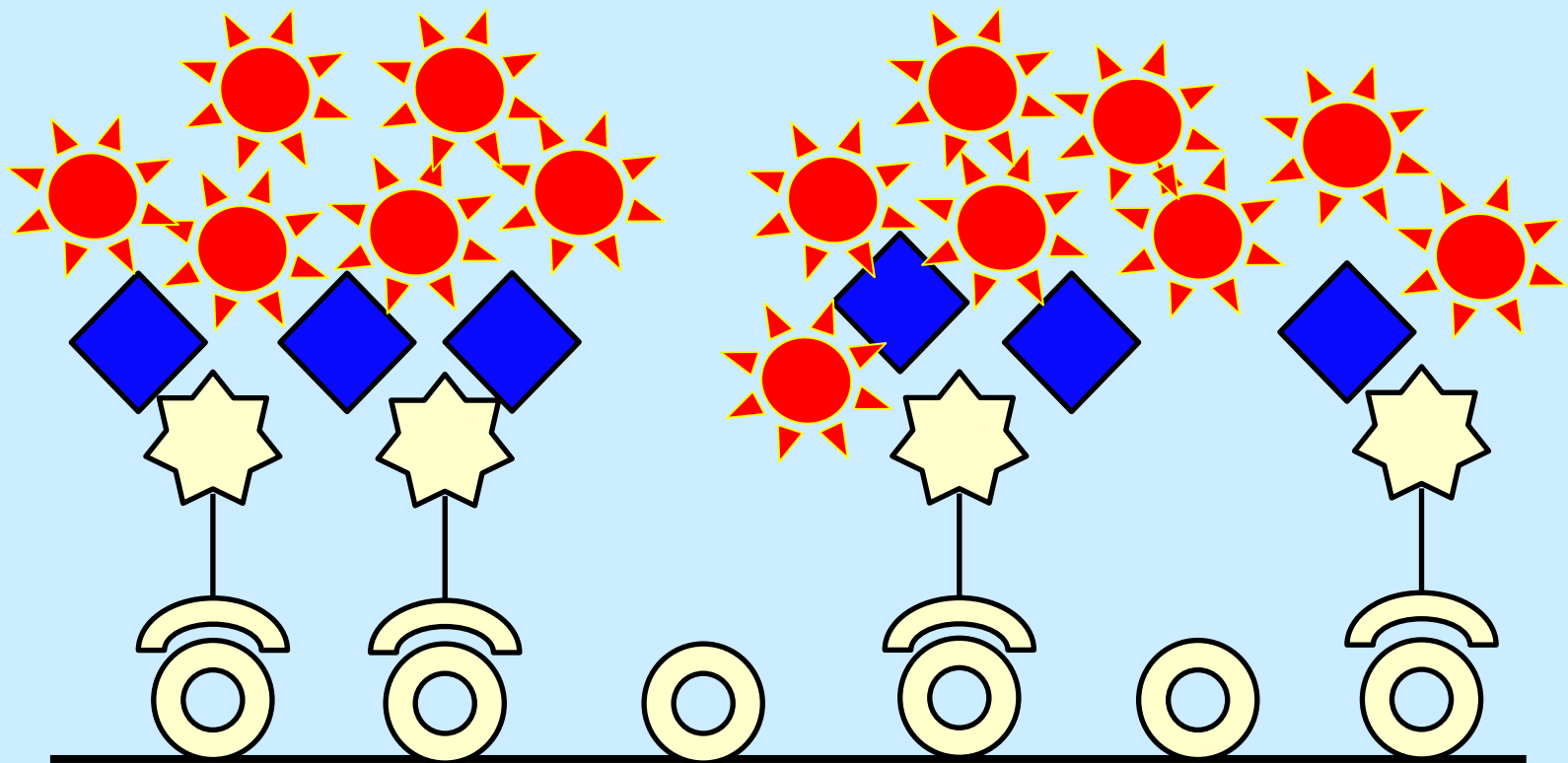


Značení enzymem



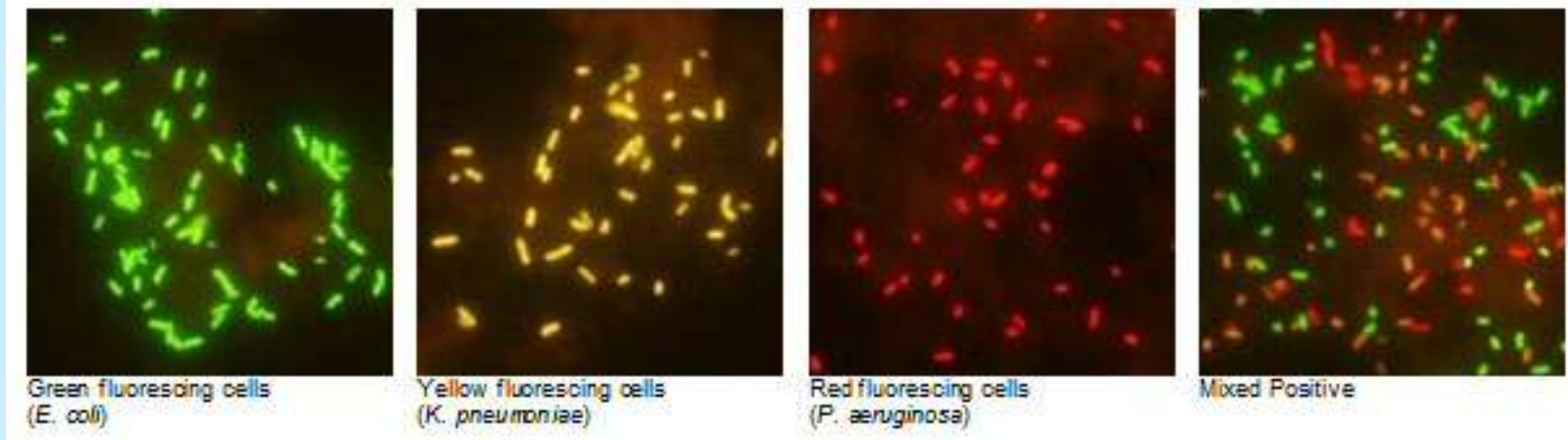
Jak označit sondu?

Nepřímé značení – polyribonukleová sonda



Dvě hlavní oblasti využití FISH v mikrobiologii

- **Analýza vzorků potravin**
- **Studium biofilmů**



Varianty FISH

- ACM-FISH
- armFISH
- CARD-FISH
- catFISH
- CB-FISH
- CO-FISH
- COBRA-FISH
- COD-FISH
- COMBO-FISH
- Comet-FISH
- Cryo-FISH
- D-FISH
- DBD-FISH
- e-FISH
- Fiber-FISH
- Flow-FISH
- Fusion-Signal FISH
- Halo-FISH
- Harlequin-FISH
- Immuno-FISH
- LNA-FISH
- M-FISH
- ML-FISH
- PCC-FISH
- PNA-FISH
- Q-FISH
- QD-FISH
- Rainbow-FISH
- Raman-FISH
- ReD-FISH
- Reverse-FISH
- RING-FISH
- RNA-FISH
- RxFISH
- Split-Signal FISH
- T-FISH
- 3-D FISH
- Zoo-FISH

Další čtení



Bottari B (2006): Application of FISH technology for microbiological analysis: current state and prospects. Appl Microbiol Biotechnol (2006) 73:485–494

<http://www.nottingham.ac.uk/biosciences/divisions/food/research/projects/foodmicrobiology.aspx>

<http://www.rapidmicrobiology.com/news/1431h22.php>

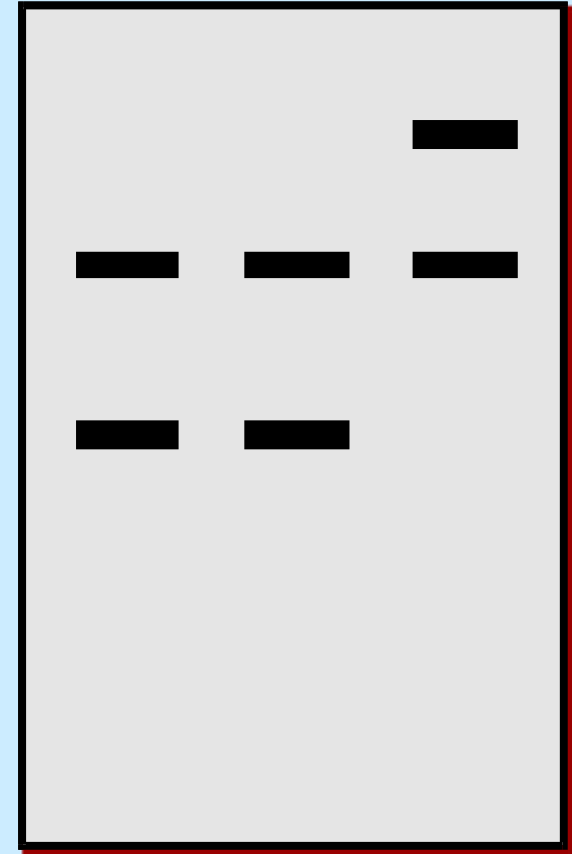
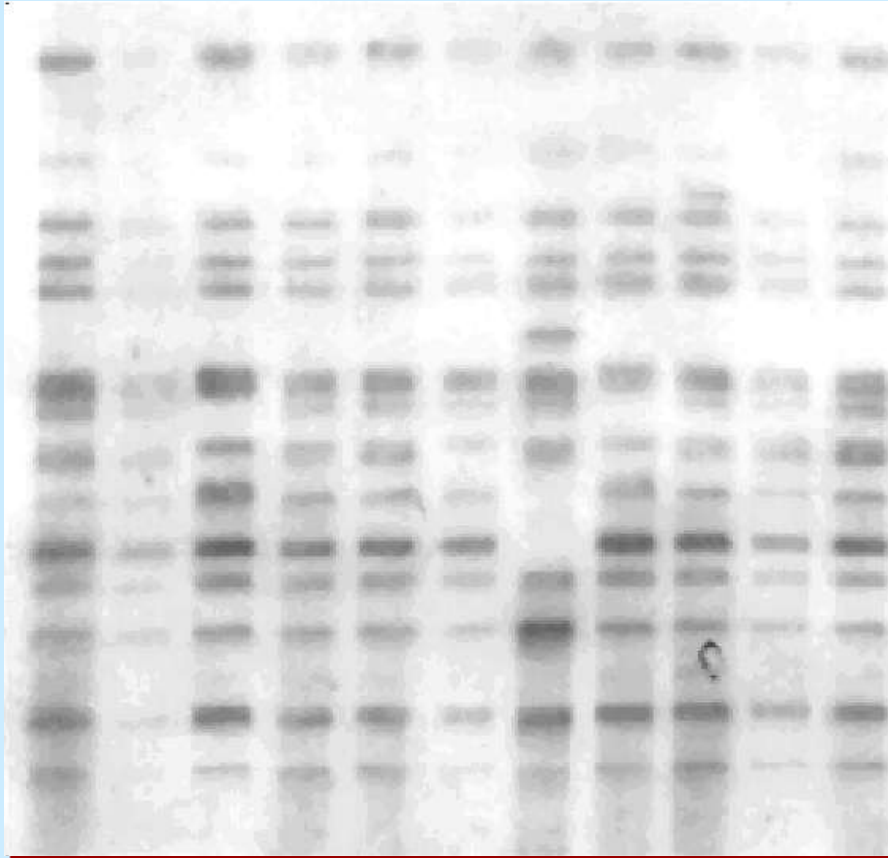
Vybrané aplikace hybridizačních technik v mikrobiologii

- **Polymorfismus délky restrikčních fragmentů (RFLP)**
- **Ribotypizace**
- **Metoda reverzní hybridizace**
- **Metoda spoligotypizace**

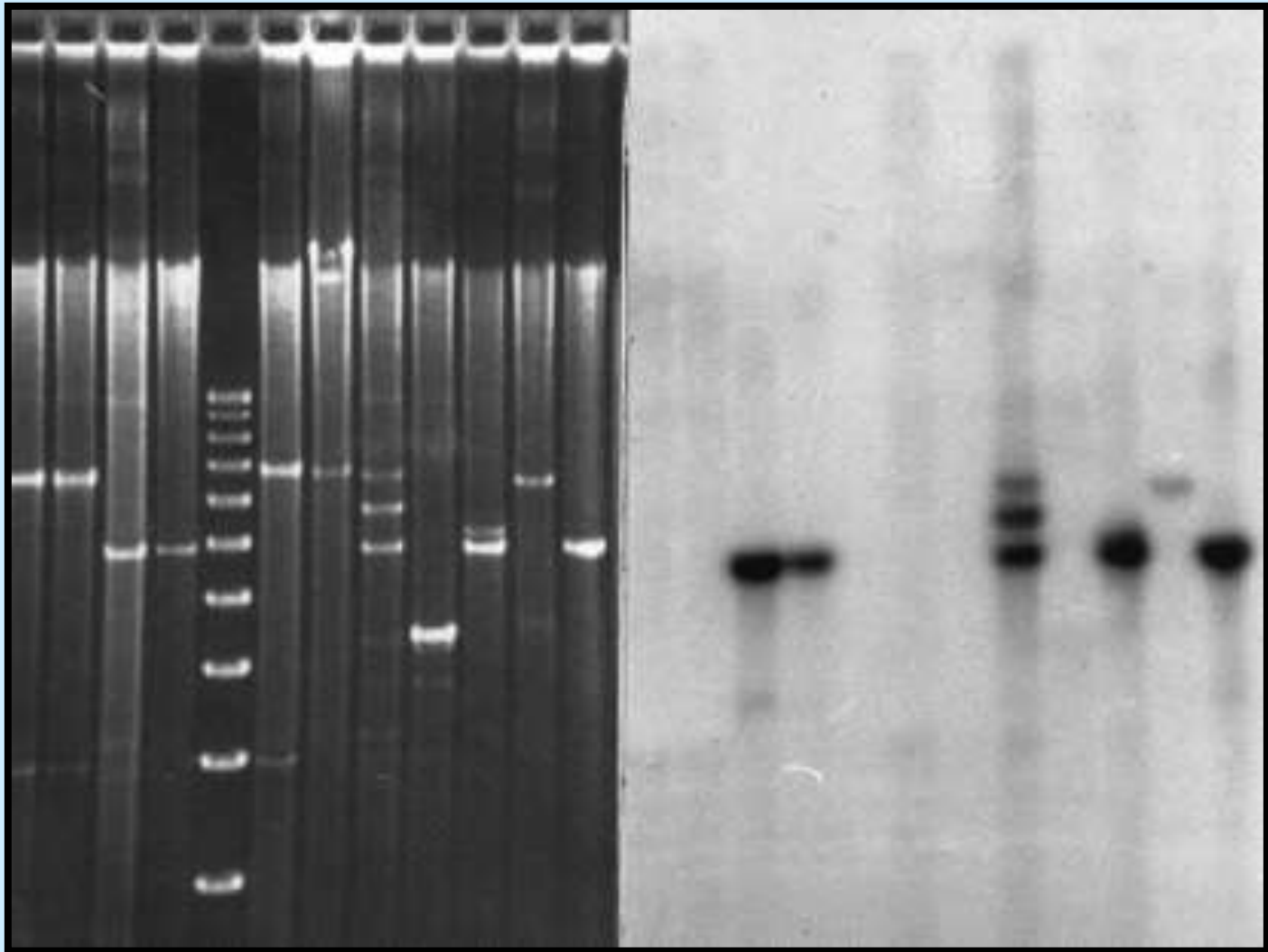
Metoda RFLP

- Restrikční fragmenty rozdělené na gelové elektroforéze
- Detekce vybraných polymorfních úseků značenou sondou
- Rozdíly ve spektru jsou dány ztrátou nebo získáním restrikčního místa, delecí nebo inzercí
- Jsou možné i změny v počtu repetitivních sekvencí nebo translokace
- Sondy z náhodně vybraných sekvencí
- Sondy ze specifických esenciálních genů nebo genů pro faktory virulence
- Sondy z IS, transpozonů a repetitivních sekvencí
- Sondy z genů pro rRNA

Zjednodušený princip RFLP



Porovnání elektroforézy a hybridizace

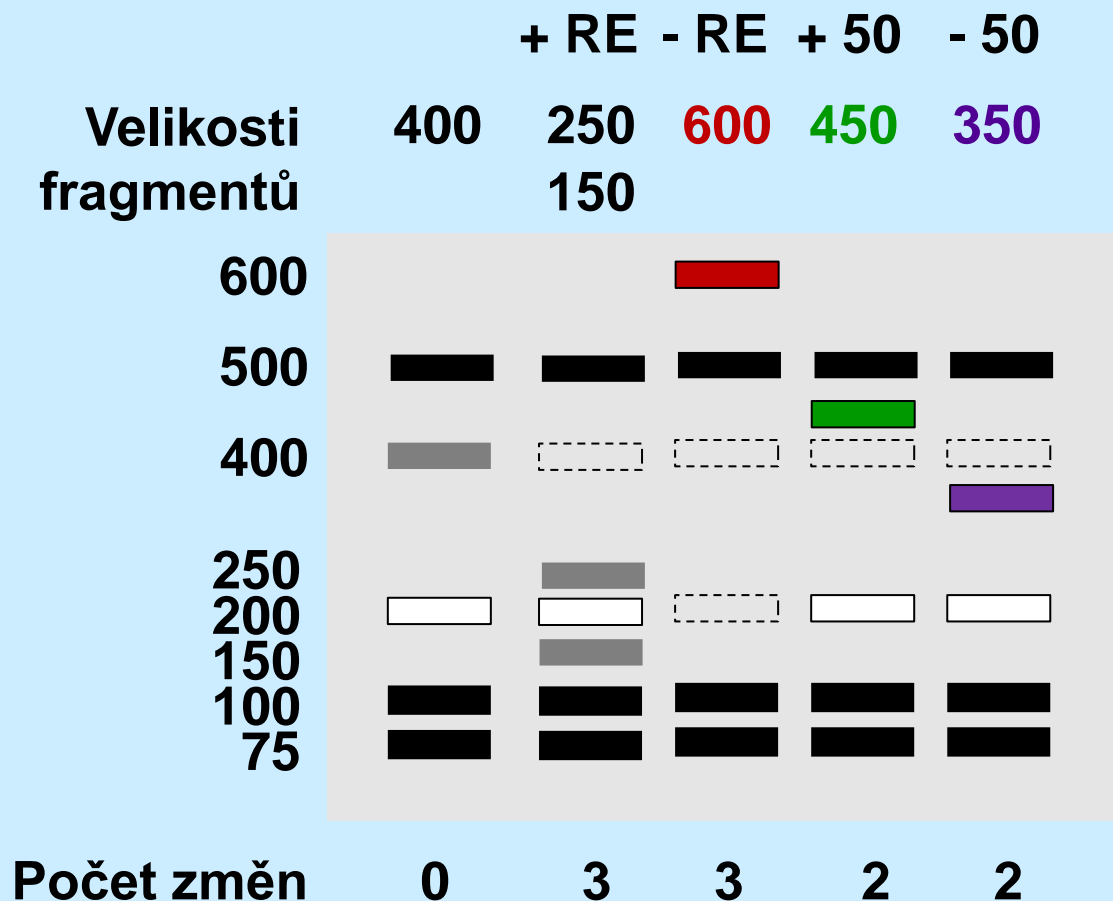


**DNA obarvená
ethidium bromidem**

autoradiogram

Naznačení analýzy RFLP profilu

Analýza změn ve fragmentu 400 bp

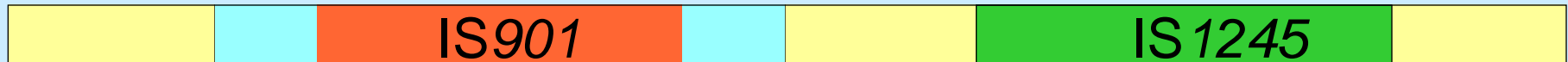


Využití RFLP v epidemiologii původců mykobakterióz

- **Epidemiologie paratuberkulózy, IS900**
- **Epidemiologie aviární tuberkulózy**
- **Analýza kmenů *MAC* v rámci jednoho chovu**
- **Analýza kmenů *MAA IS901* u jedince**
- **Analýza smíšených infekcí kmenů *MAC***

Inzerční sekvence u vybraných mykobakterií

M. avium subsp. avium serotypy 1-3, ***M. avium subsp. silvaticum***



M. avium subsp. hominissuis serotypy 4-6, 8-11 a 21



FR300bp

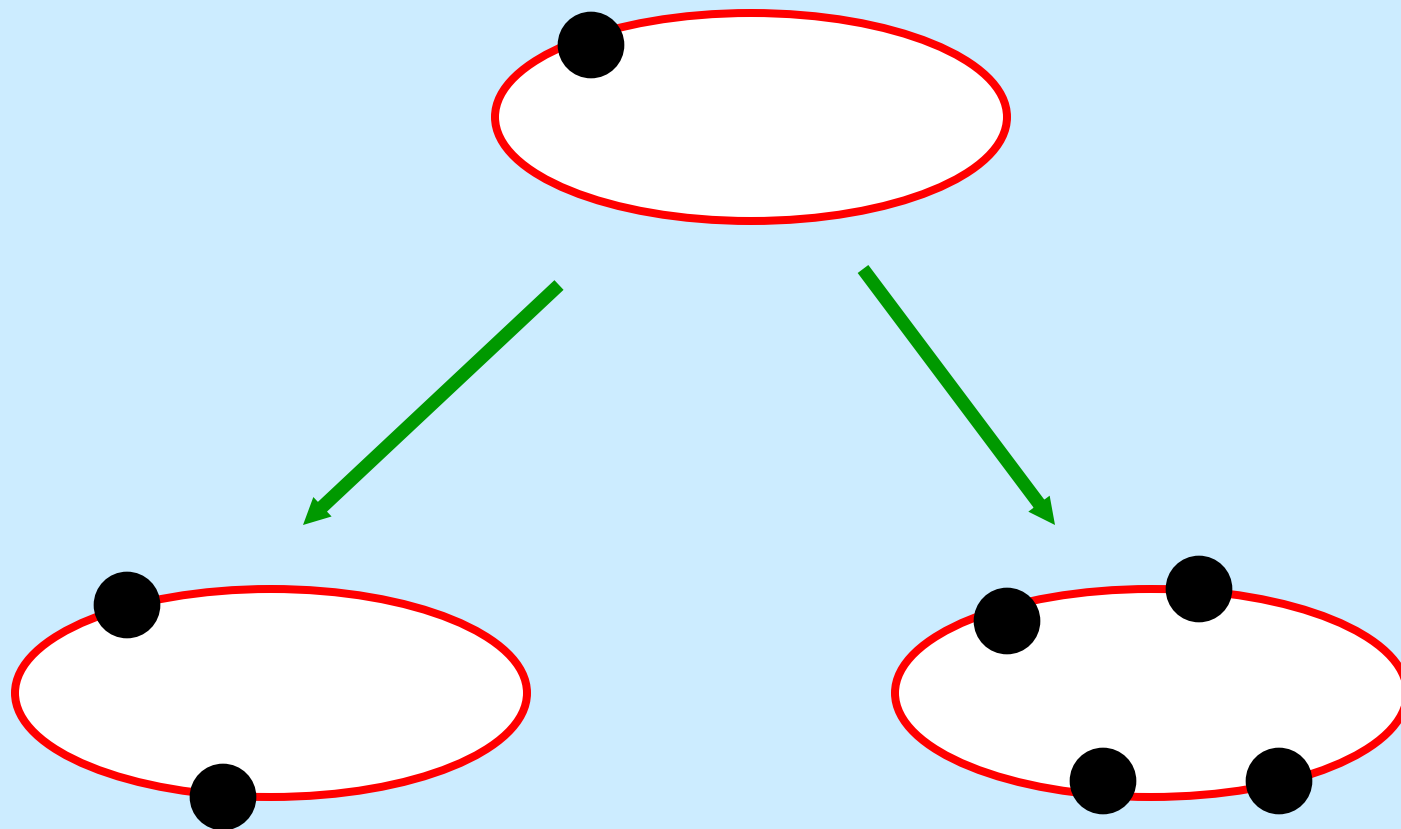
M. avium subsp. paratuberculosis



M. intracellulare serotypy 7, 12-20, 22-28



Inzerční sekvence transponují



- **Kopie IS se chovají jako bodové mutace**
- **Důsledkem transpozice jsou různé RFLP profily**

**Pro studium epidemiologie
MAA je vhodná *IS901***

Pro *MAP* potom *IS900*



RFLP profily na bázi IS901 - MAA

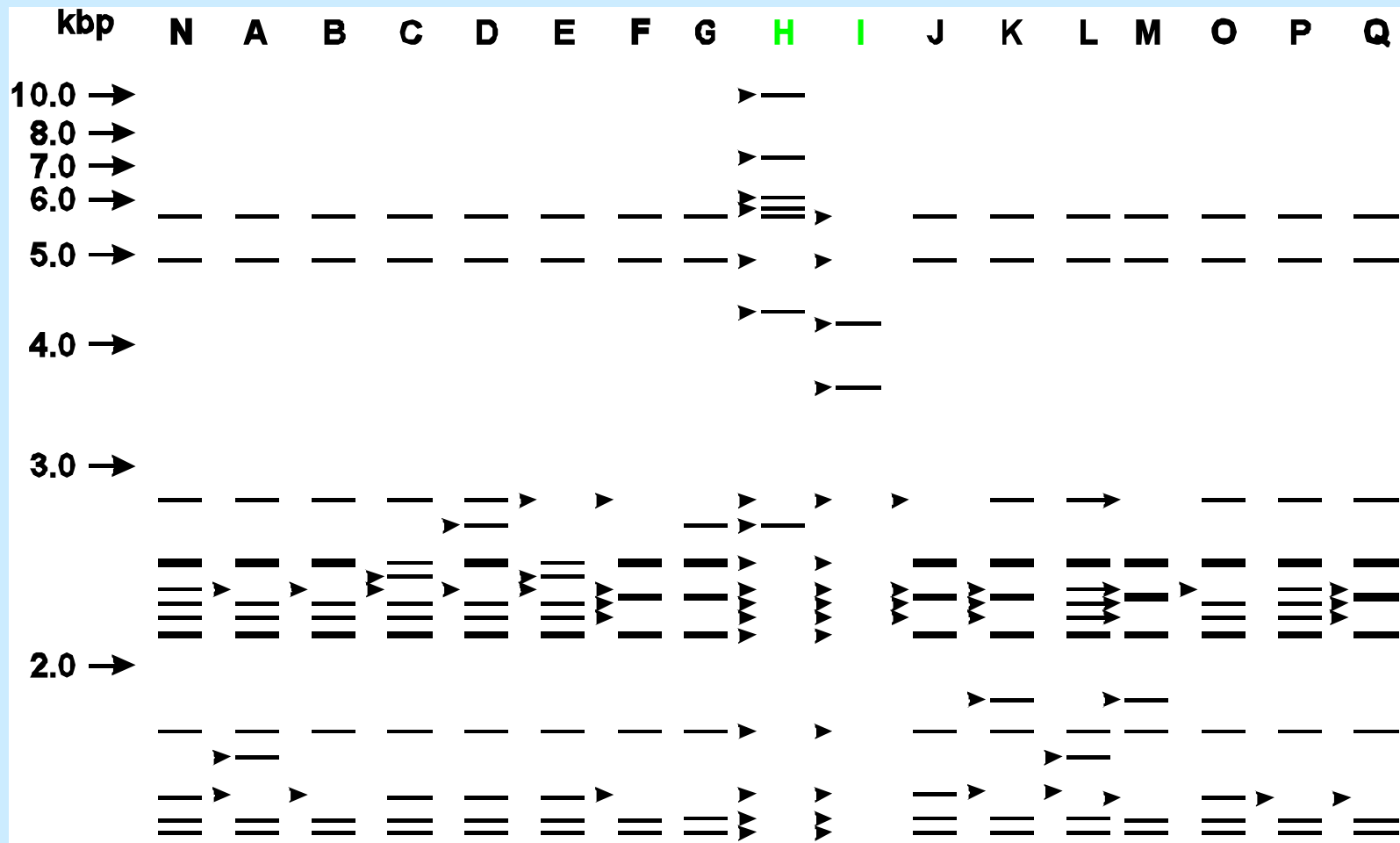
Pvull - IS901 RFLP profily

- **25 vícekopiových profilů**
- **3 profily o malém počtu kopií**
- **celkem 28 RFLP typů**

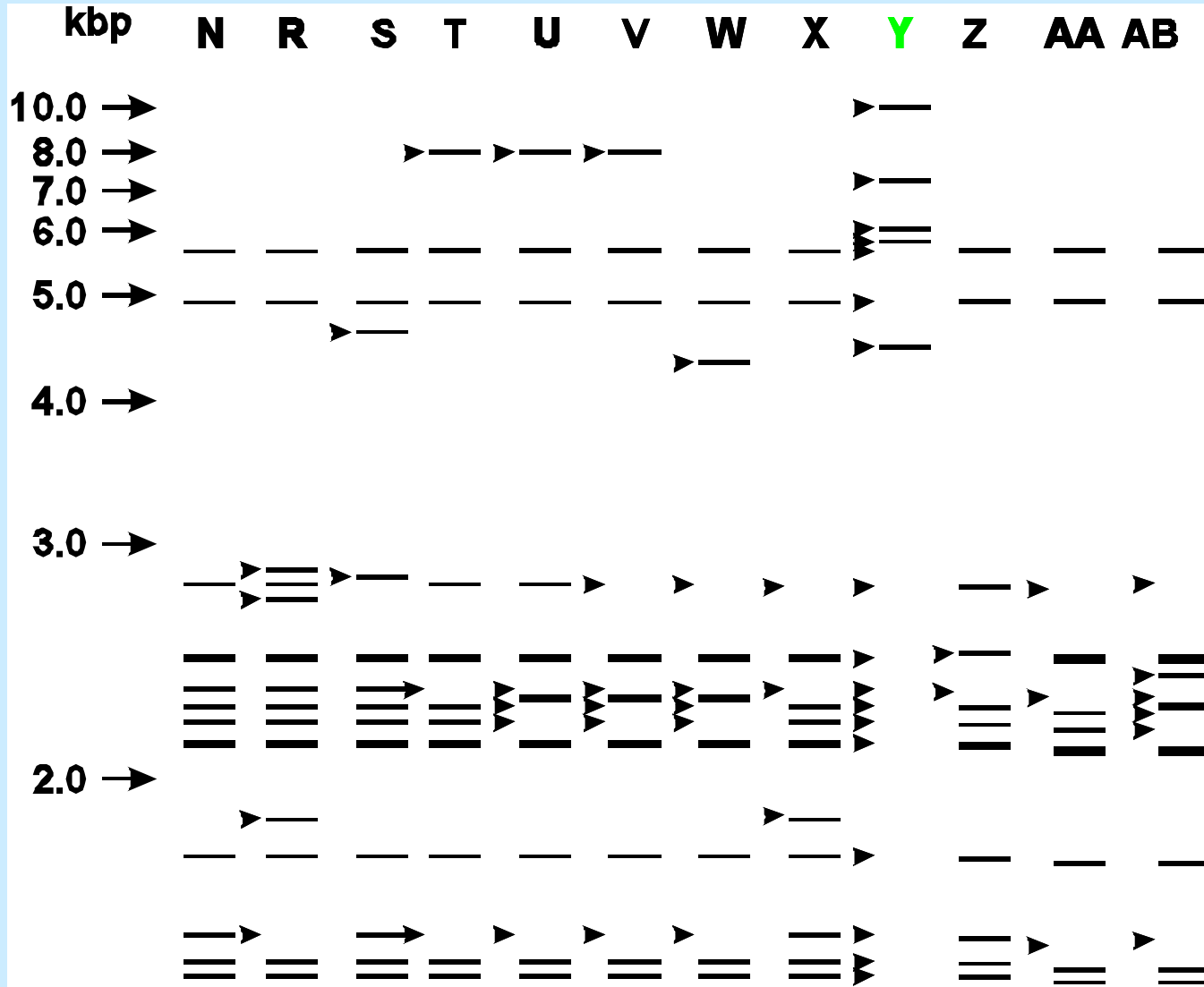
Pstl - IS901 RFLP profily

- **4 vícekopiové profily**
- **1 profil o malém počtu kopií**
- **celkem 25 RFLP typů**

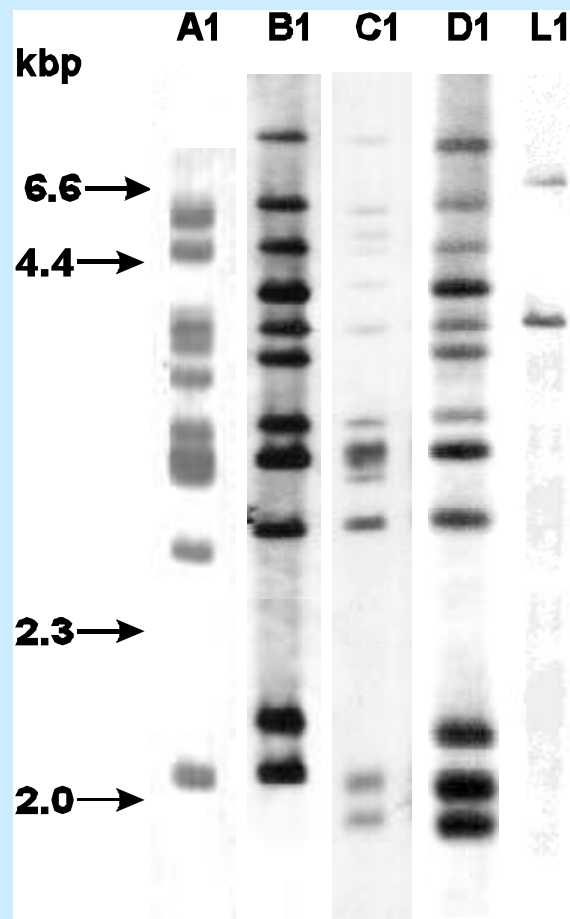
PvuII - IS901 RFLP profily - 1



PvuII - IS901 RFLP profily - 2

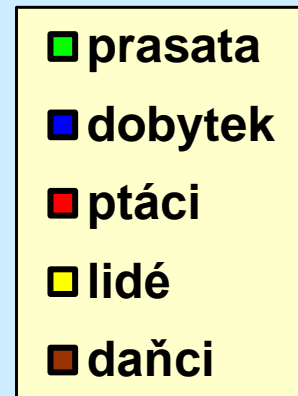
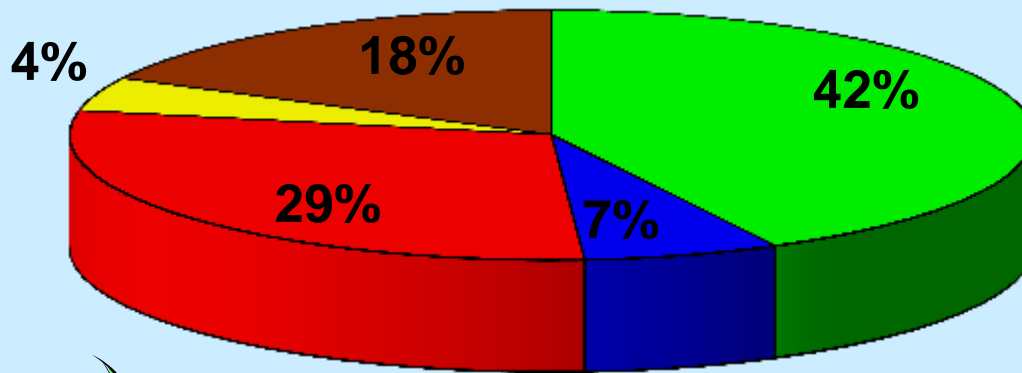
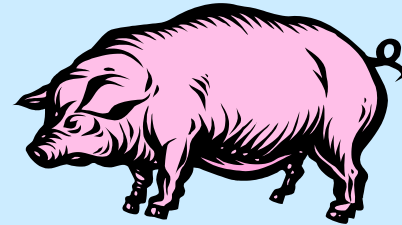


Vybrané PstI - IS901 RFLP profily

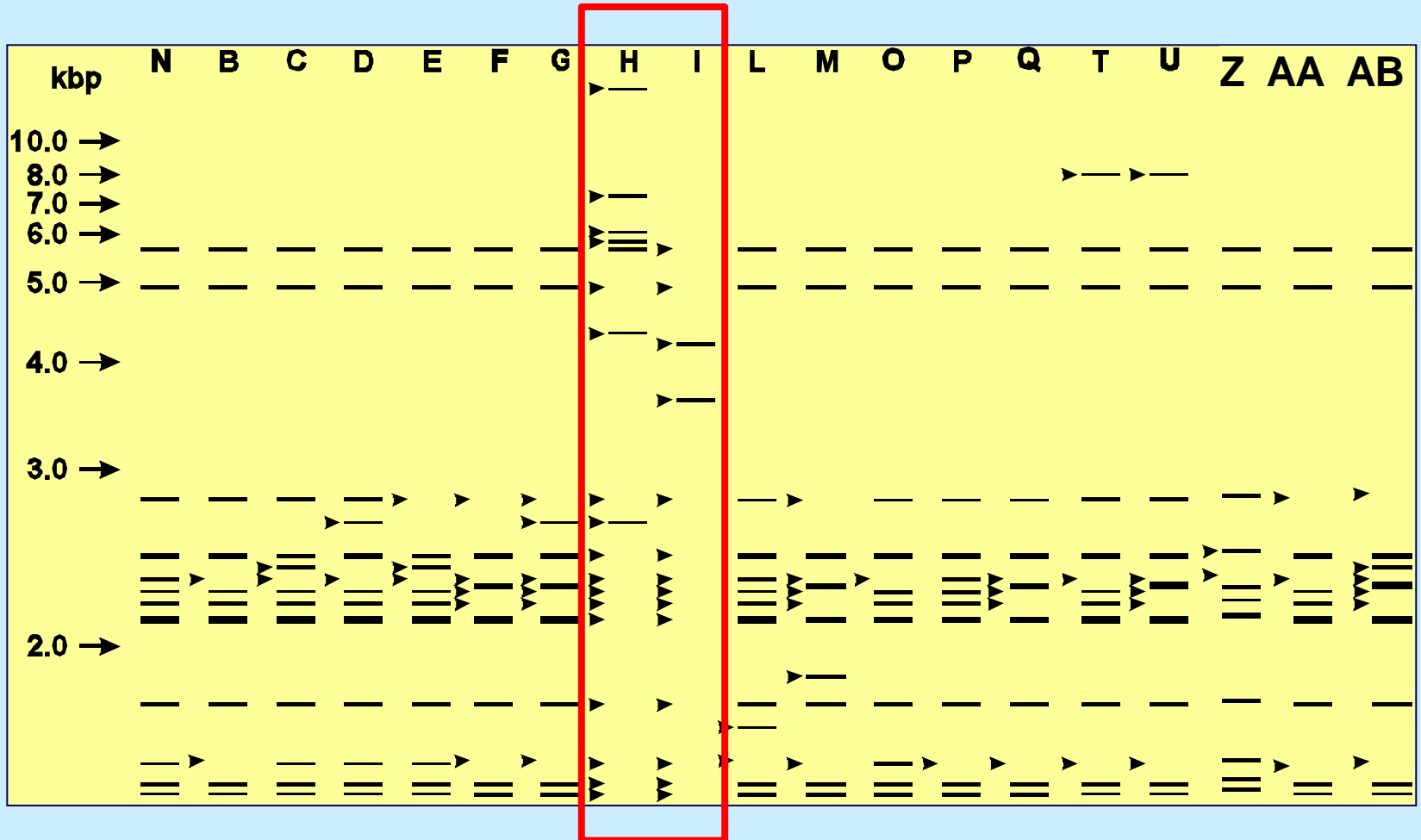


Využití při epidemiologických studiích

Původ celkem 137 izolátů



RFLP typy získané u ptáků, zvířat a lidí

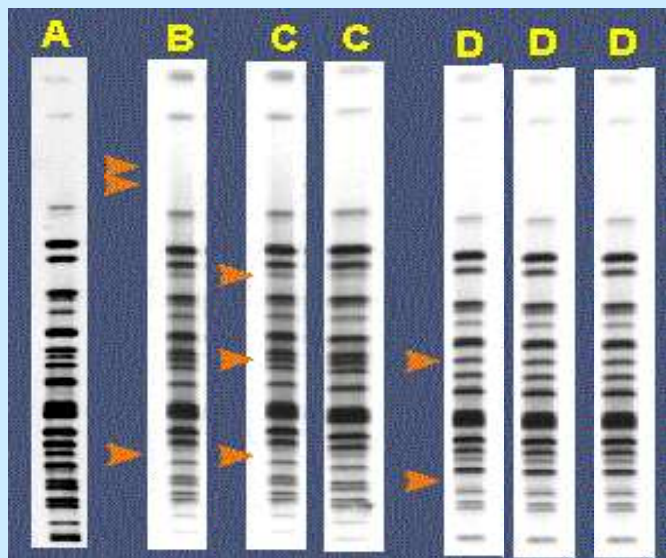


Specifické profily u izolátů od lidí

Standardizace metody

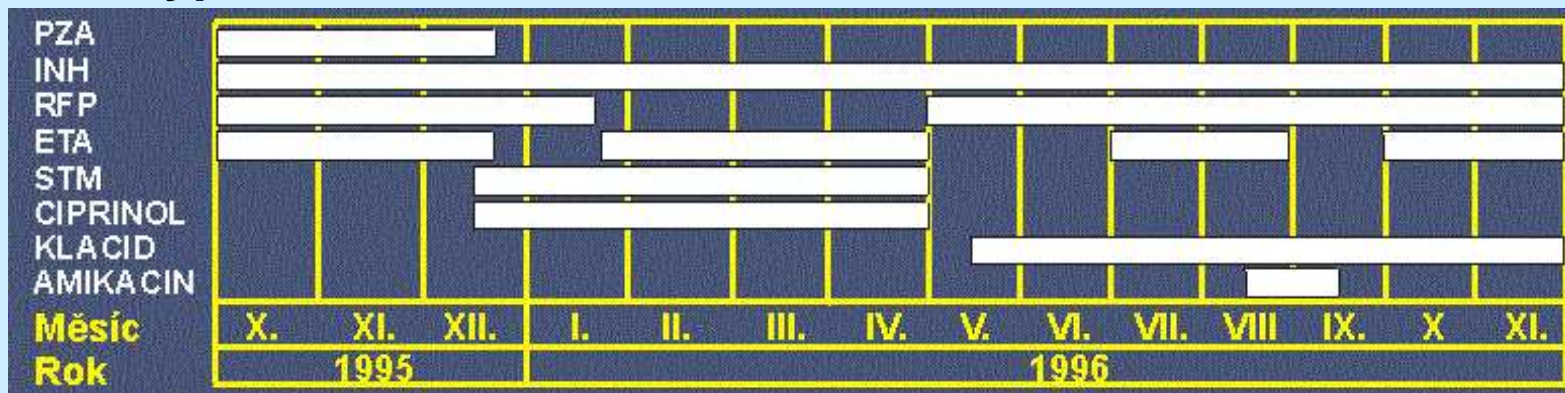
**Dvorská, L. – Bull, T.J. – Bartoš, M. –
Mátlová, L. - Švástová, P. – Weston, T.R. -
Parmová, I. – Van Soolingen, D. - Pavlík, I.:
A standardised Restriction Fragment
Length Polymorphism (RFLP) method for
typing *Mycobacterium avium* strains links
IS901 with virulence for birds.
Journal of Microbiological Methods;
2003, 55, 11-27**

Analýza klinického případu u člověka



Serotyp

6 6/9 9 9 6/9 9 9



Analýza primokultur



A



A

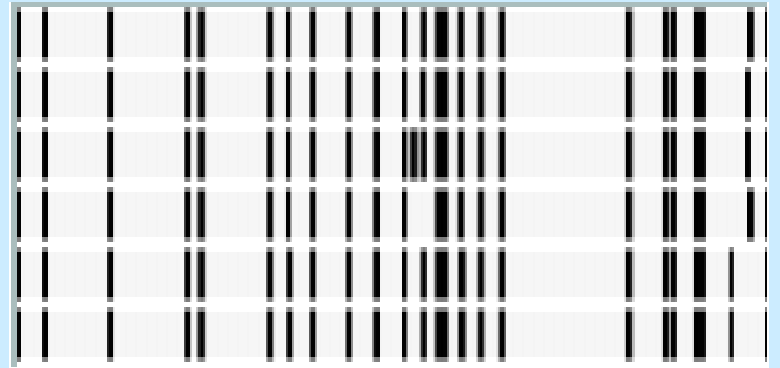
A

A1

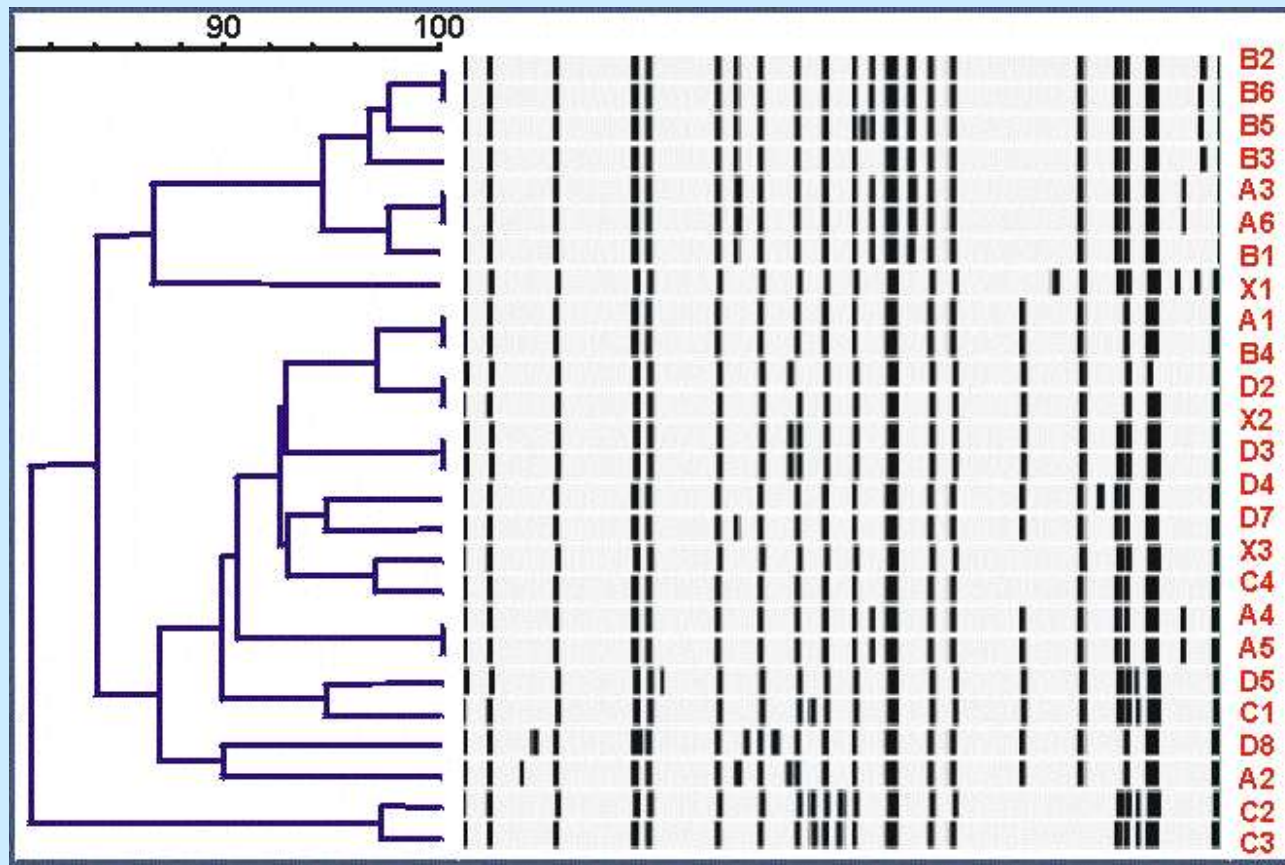
A2

A3

A3



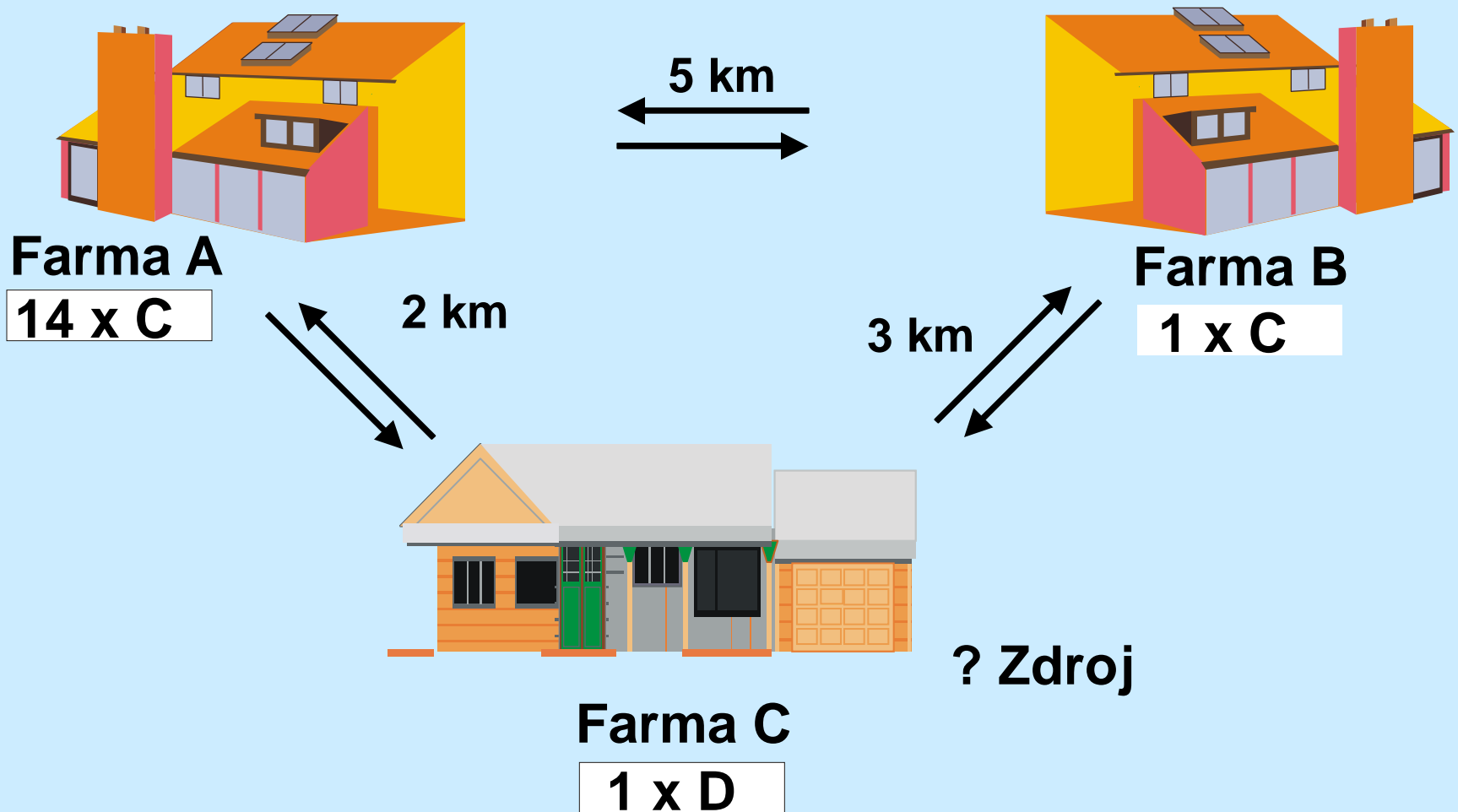
Analýza sekundárních kultur



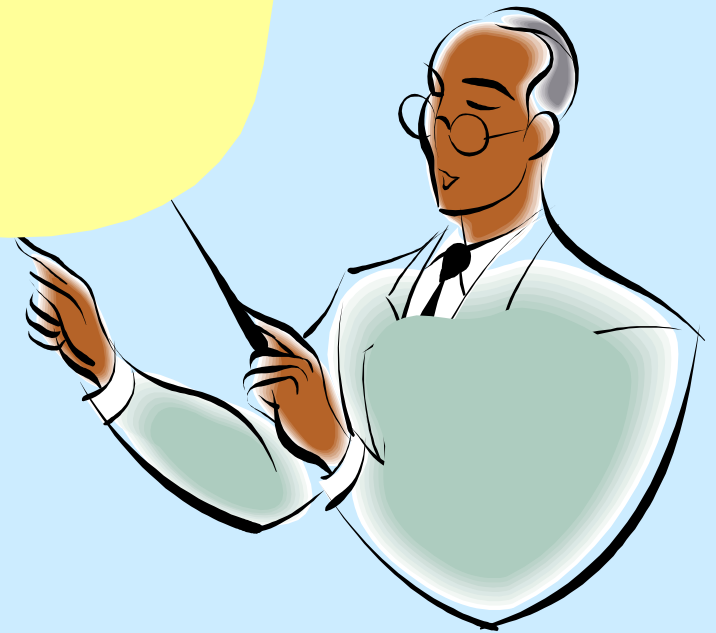
Pracovní hypotézy

- 1) Opakovaná infekce z vnějšího zdroje**
- 2) Dočasné utlumení infekce a její reaktivace**
- 3) Selektce rezistentních kmenů
antituberkulotiky**

Studium přenosu MAA mezi různými farmami



**Ke studiu epidemiologie *M. a.*
paratuberculosis se používá
IS900**



RFLP profily na bázi IS900 - MAP

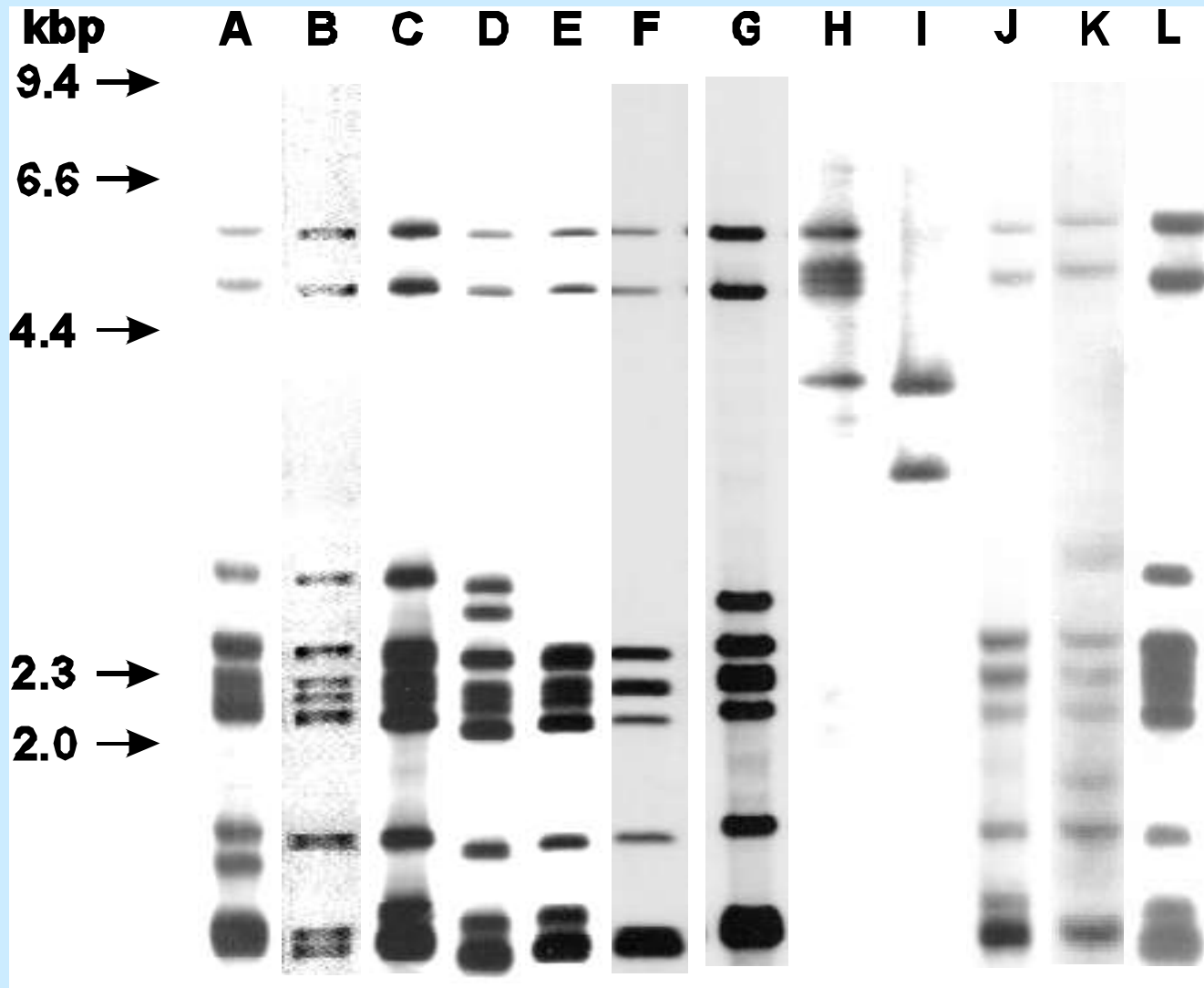
BstEI - IS900 RFLP profily

- **33 vícekopiových profilů**
- **3 profily s nízkým počtem kopií**
- **celkem 35 vícekopiových profilů**

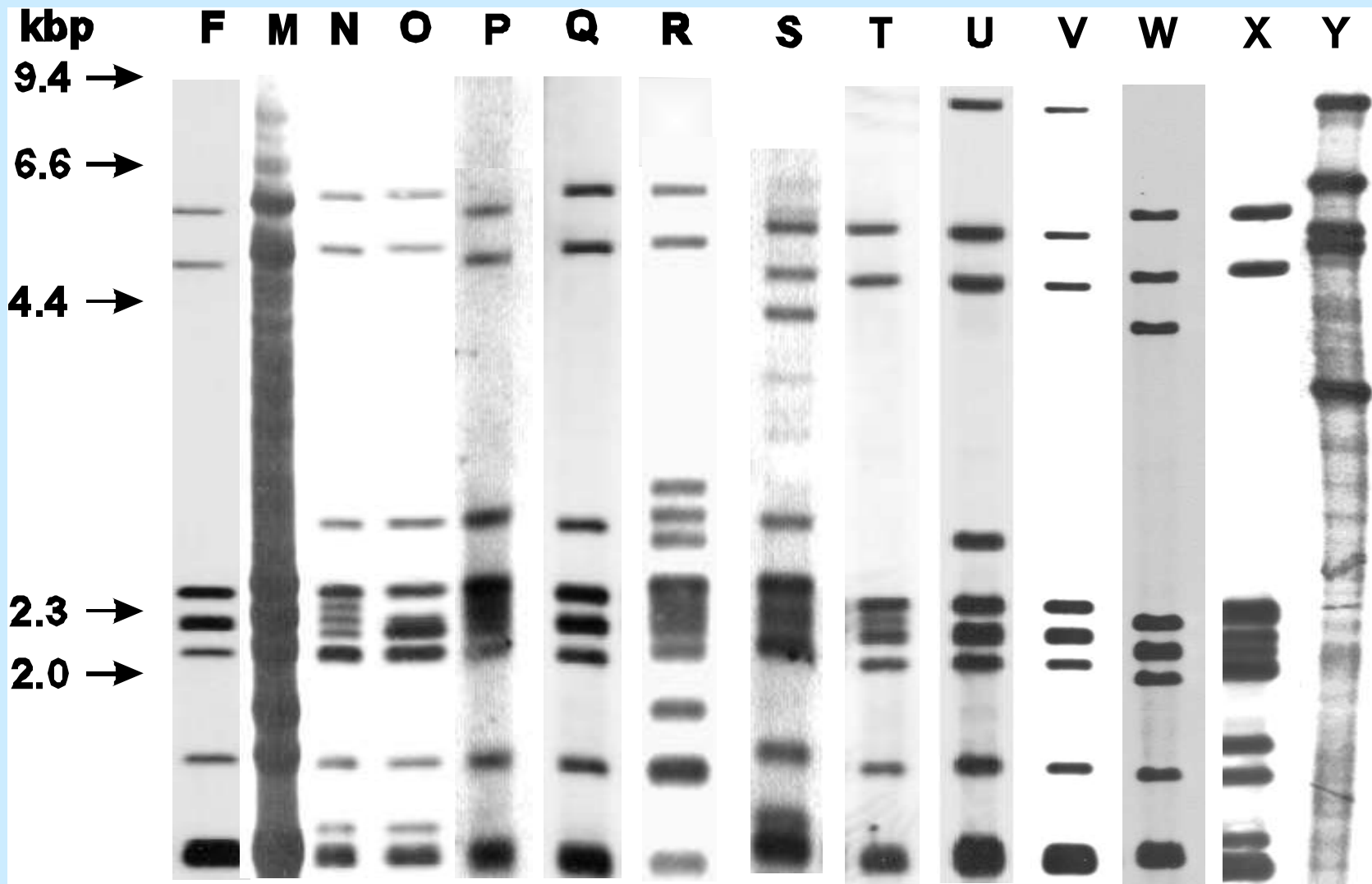
PstI - IS900 RFLP profily

- **24 vícekopiových profilů**
- **1 profil s nízkým počtem kopií**
- **celkem 25 RFLP typů**

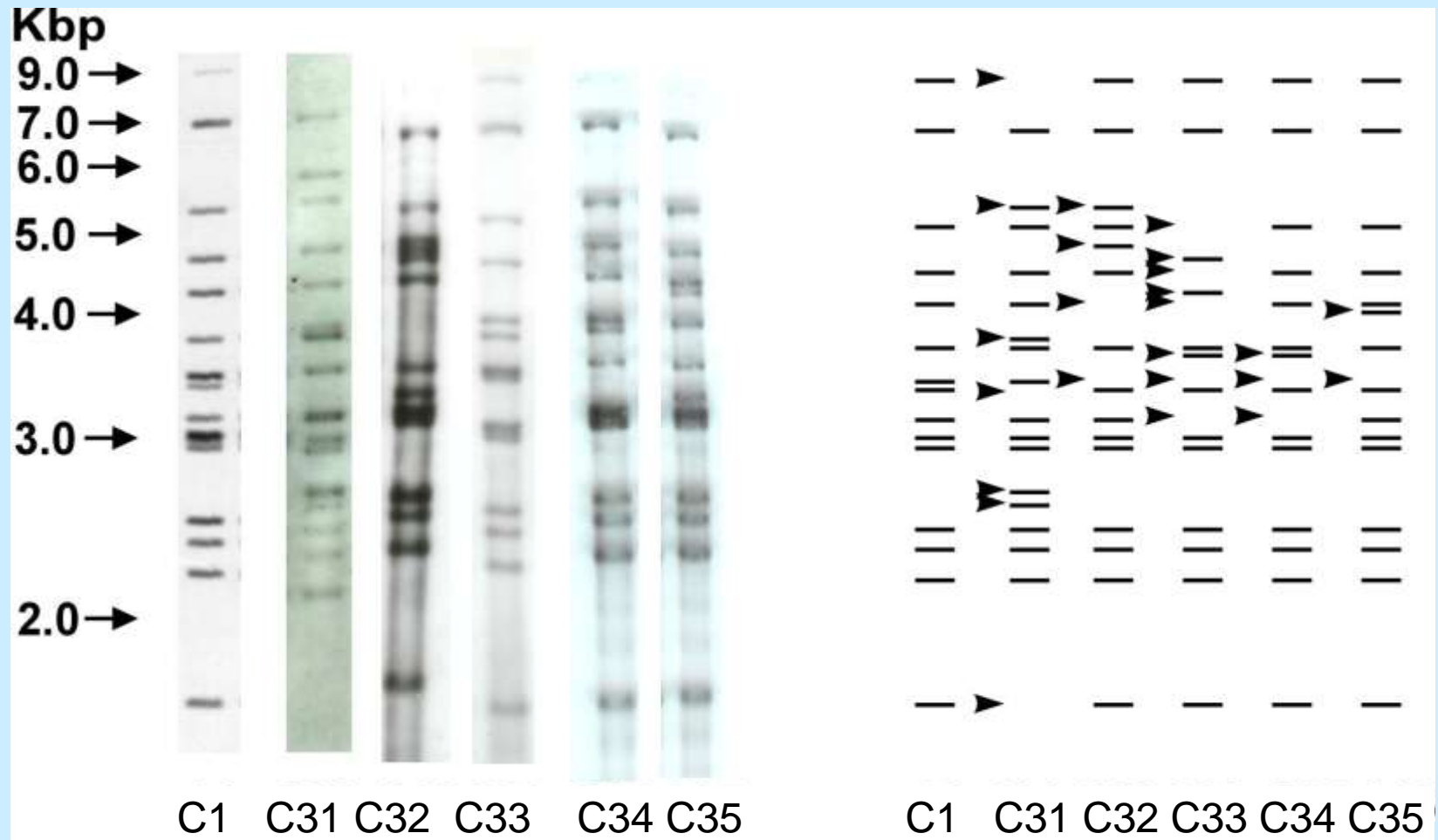
BstEII - IS900 RFLP profily I



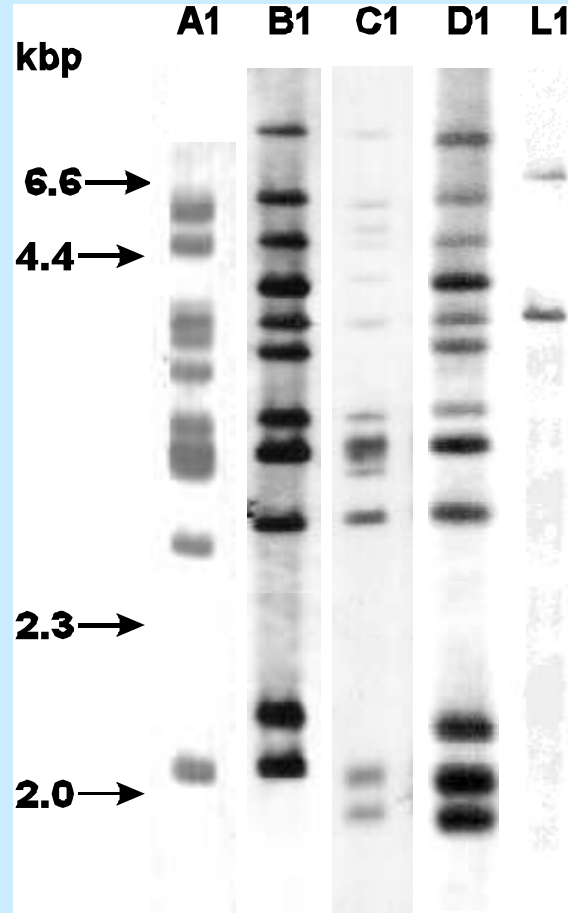
BstEII - IS900 RFLP profily II



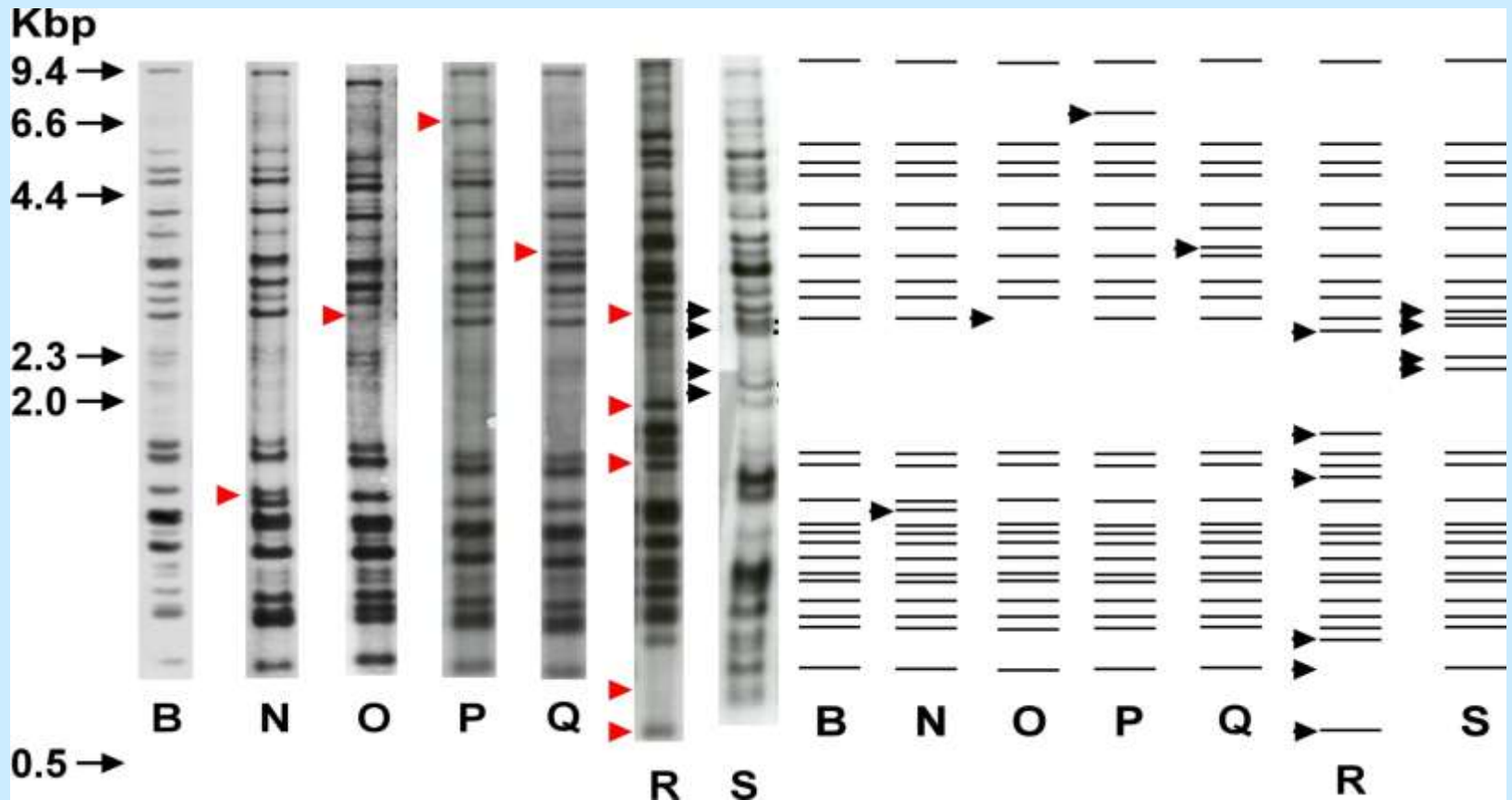
BstEII - IS900 RFLP profily III



*Pst*I - IS900 RFLP profily I



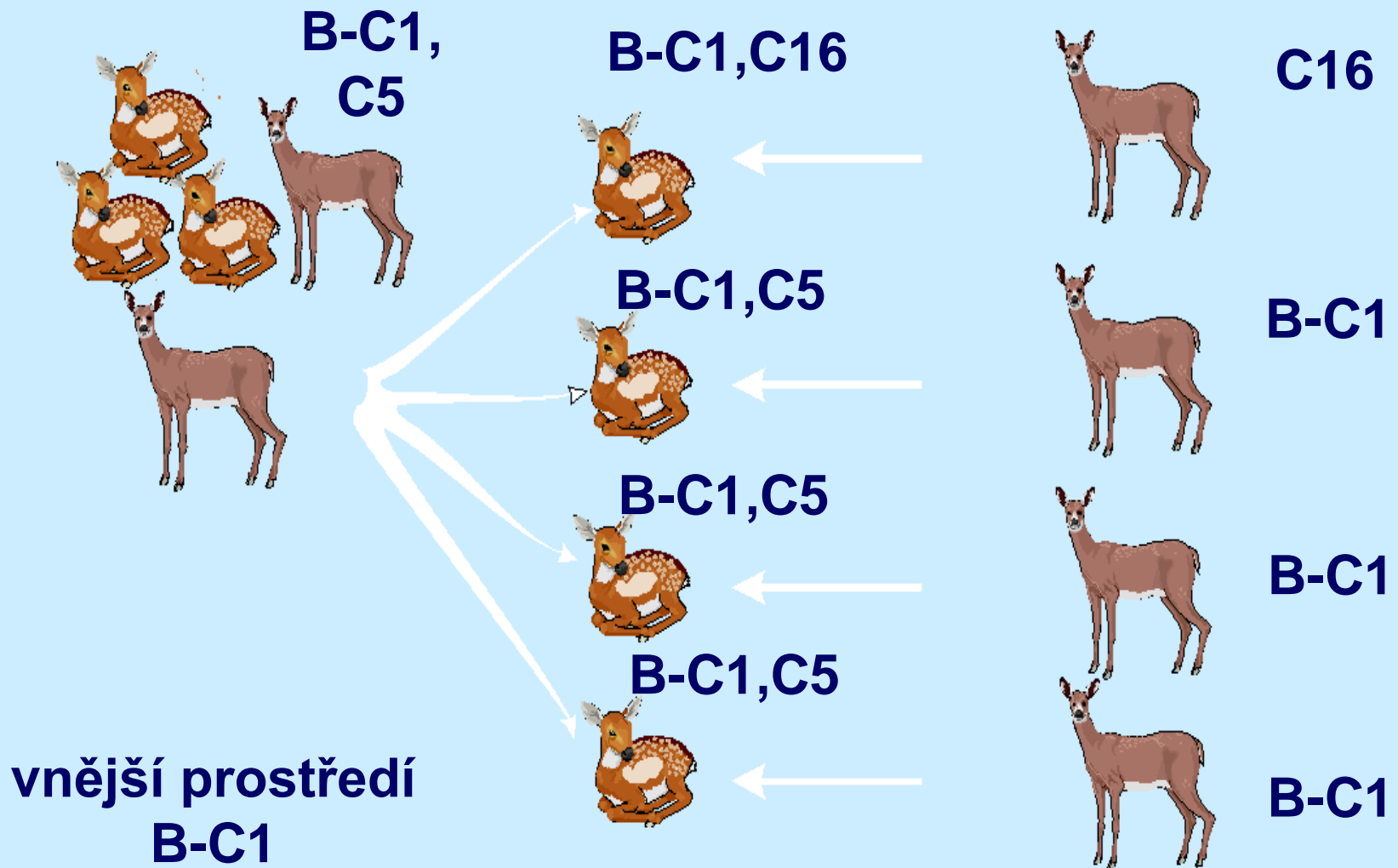
*Pst*I - IS900 RFLP profily II



Paratuberkulóza u divokých přežvýkavců v ČR (1995-2000)

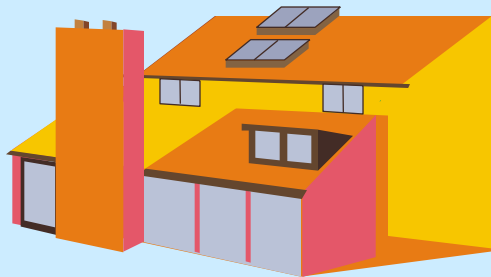


Paratuberkulóza u faremčně chovaných jelenů



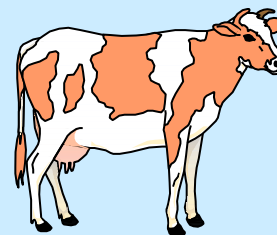
Detekce tří kmenů různých RFLP typů u jedné krávy

V letech 1995 až 2001



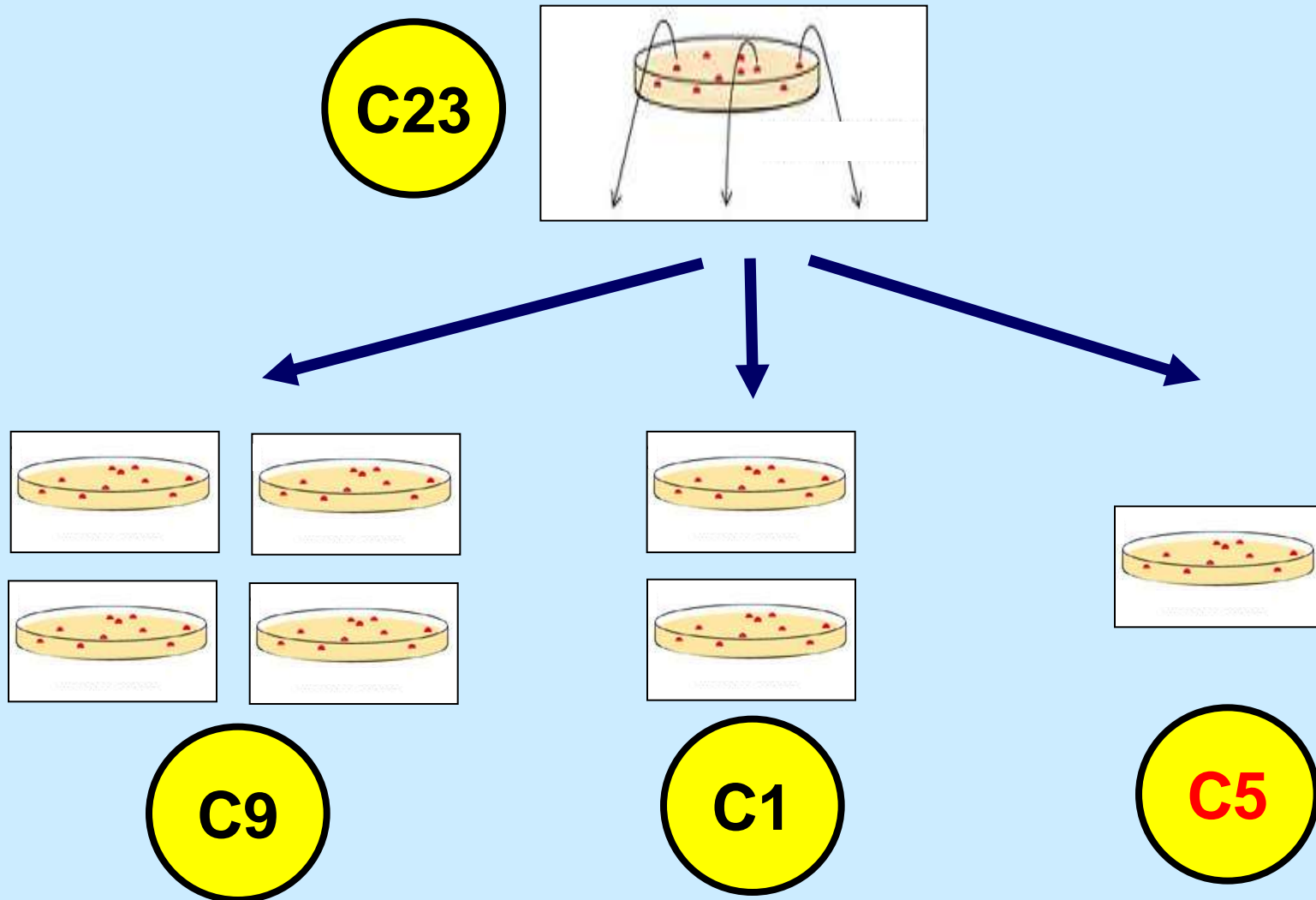
C1 C9

V roce 2002

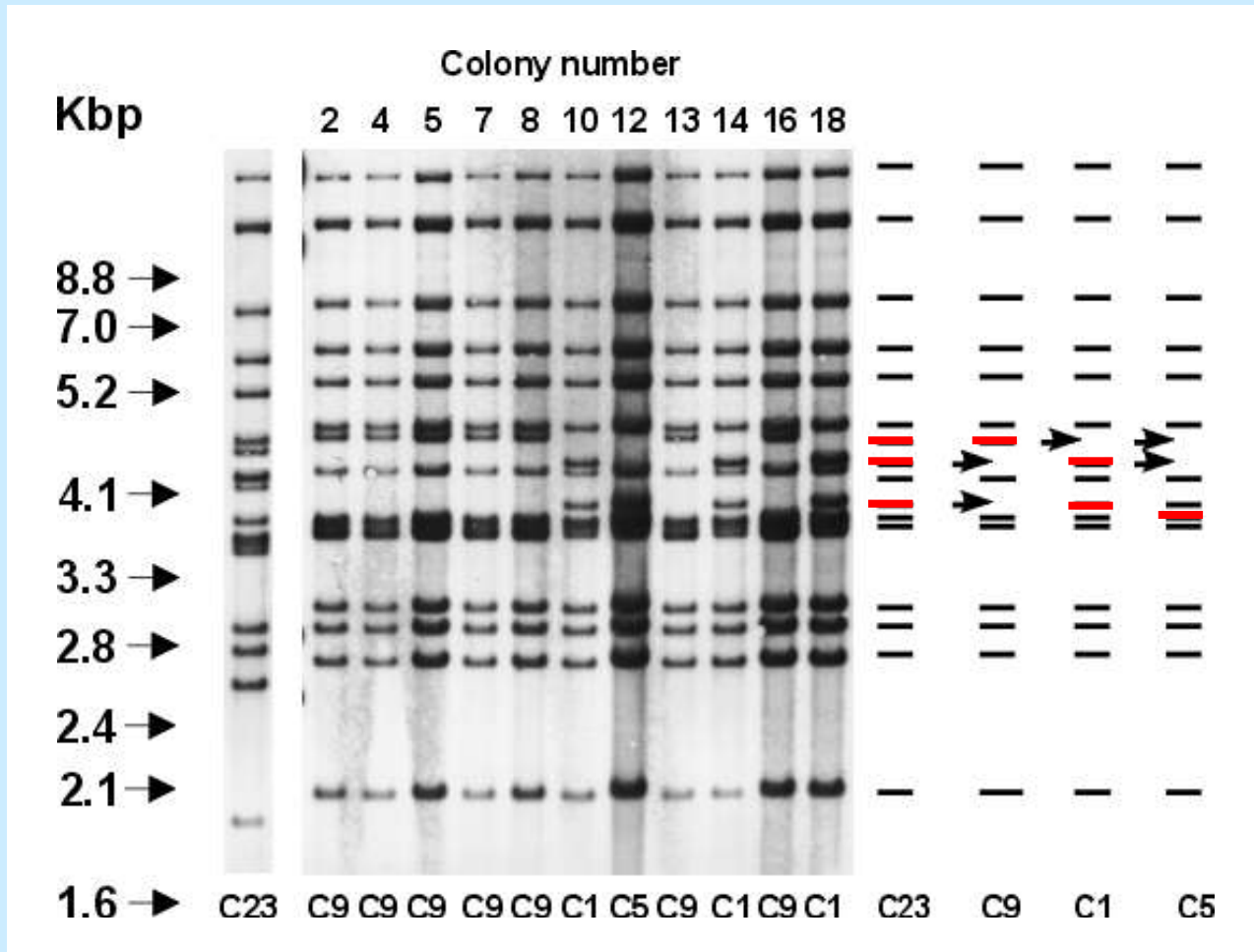


C23

Rozklonování izolátu č. 23



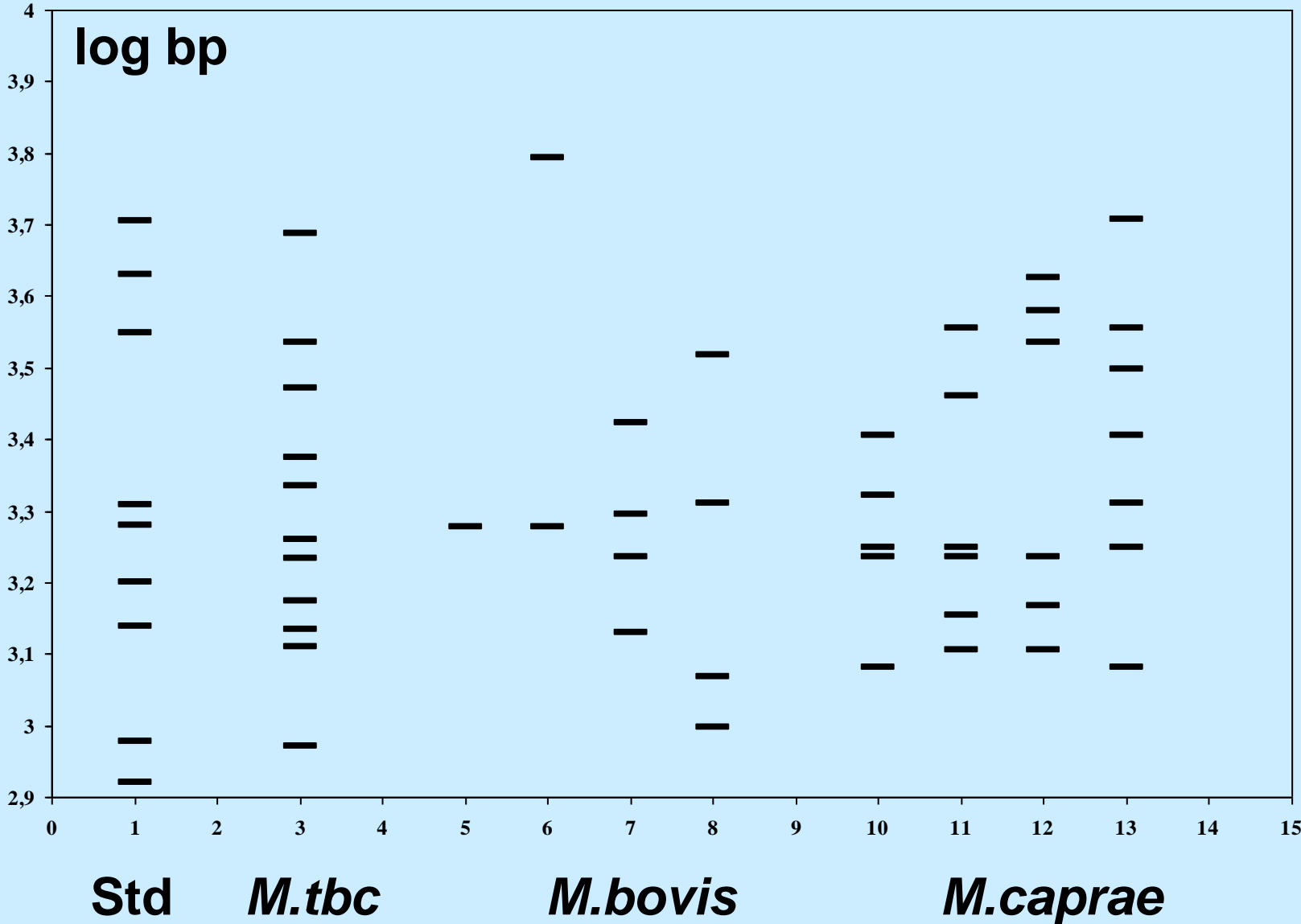
Porovnání výsledných RFLP profilů



**Pro studium epidemiologie
M. tuberculosis se používá
IS6110**



IS 6110 RFLP *M. tuberculosis*, *M. bovis* a *M. caprae*





Proč to celé neosekvenujete a hotovo!

Není tato metoda dnes poněkud zastaralá?

Sekvenování je příliš citlivá metoda a nesehadno odhaluje klonalitu



Ribotypizace

Varianta RFLP využívající sond připravených z genů pro 16S rRNA nebo 23S rRNA

- **Sekvence genu pro 16S rRNA se používají k fylogenetickým studiím**
- **Počet kopií genu pro 16S rRNA je malý, do 6 ks**
- **Výsledná spektra jsou jednoduchá**
- **Popsáno u *Listeria* (80 spekter), *Salmonella* (97), *Escherichia* (65) a *Staphylococcus* (252)**

Zodpovězte otázku

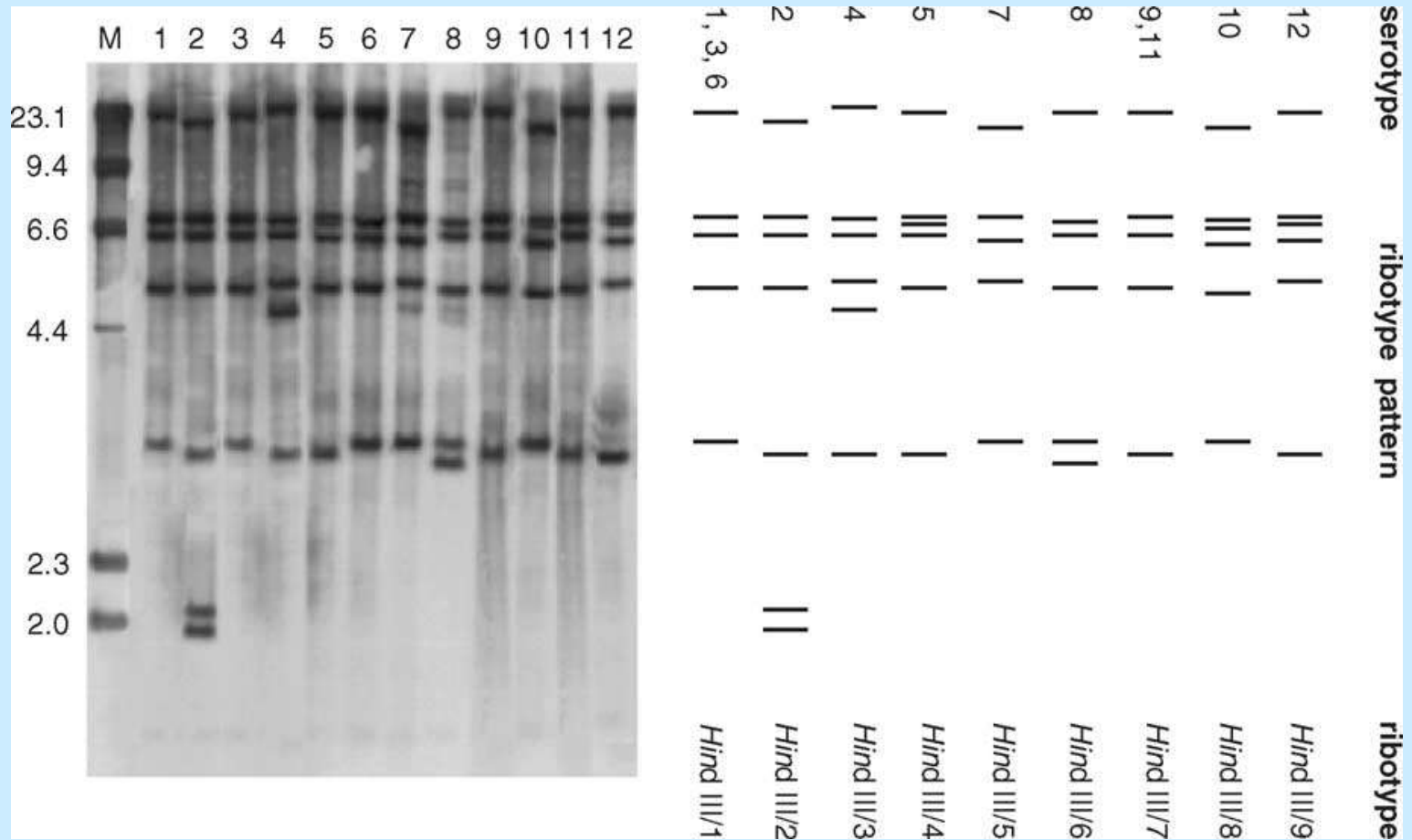


Kde se v buňce nachází 16S rRNA?

A kde se nachází 23S rRNA?

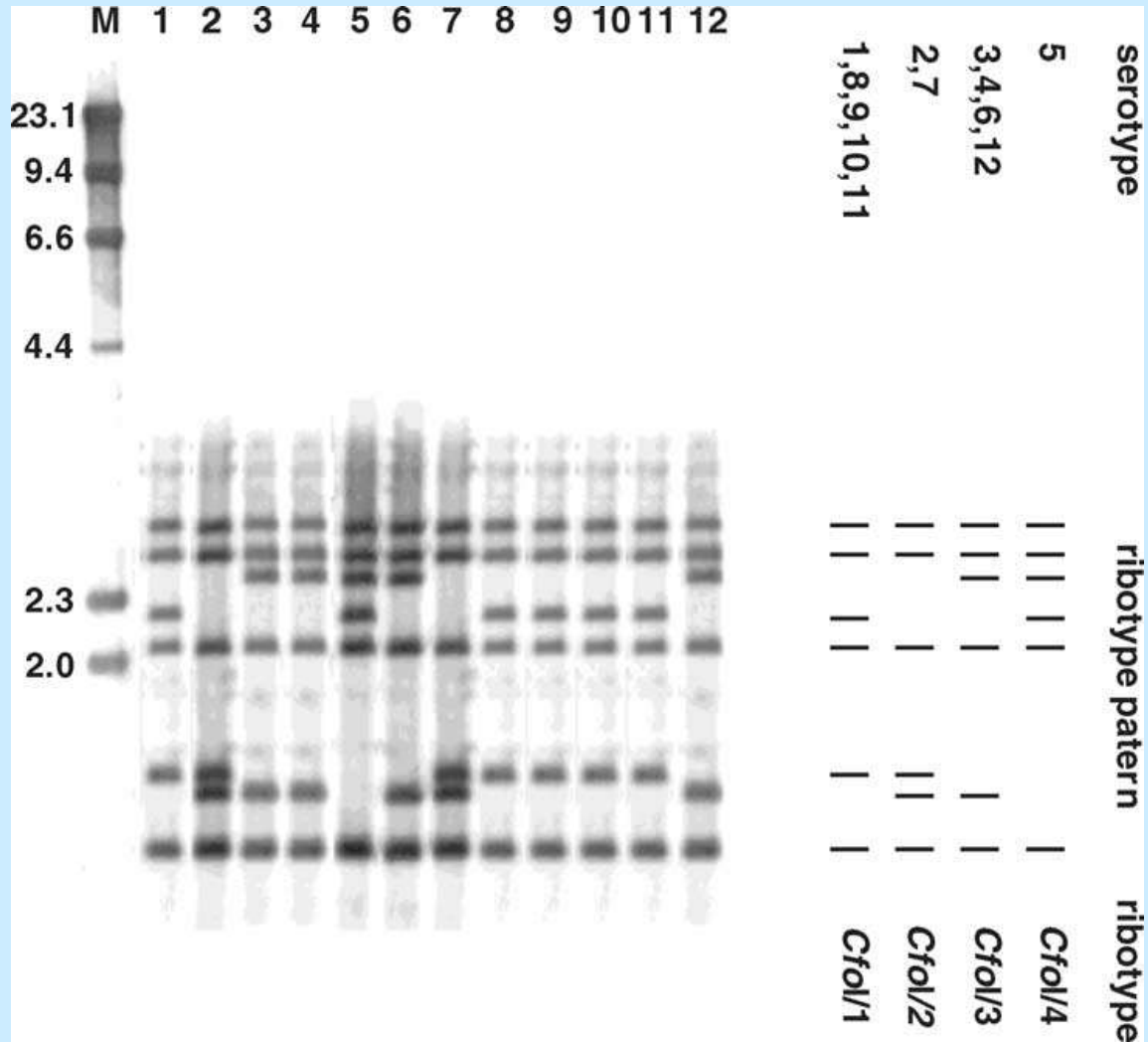
Ribotypizace

Actinobacillus pleuropneumoniae 16S rRNA/*Hind*III



Ribotypizace

Actinobacillus pleuropneumoniae 16S rRNA/CfoI



Úkol



Analýzou výše uvedených spekter ribotypů stanovte počet genů pro 16S rRNA u *Actinobacillus pleuropneumoniae*, jestliže ani *Hind*III ani *Cfo*I neštěpí uvnitř genu.

Ze spekter po štěpení *Cfo*I vyplývá, že je zde 6 kopií genu pro 16S rRNA.

Spektra po štěpení *Hind*III nejsou čistá.

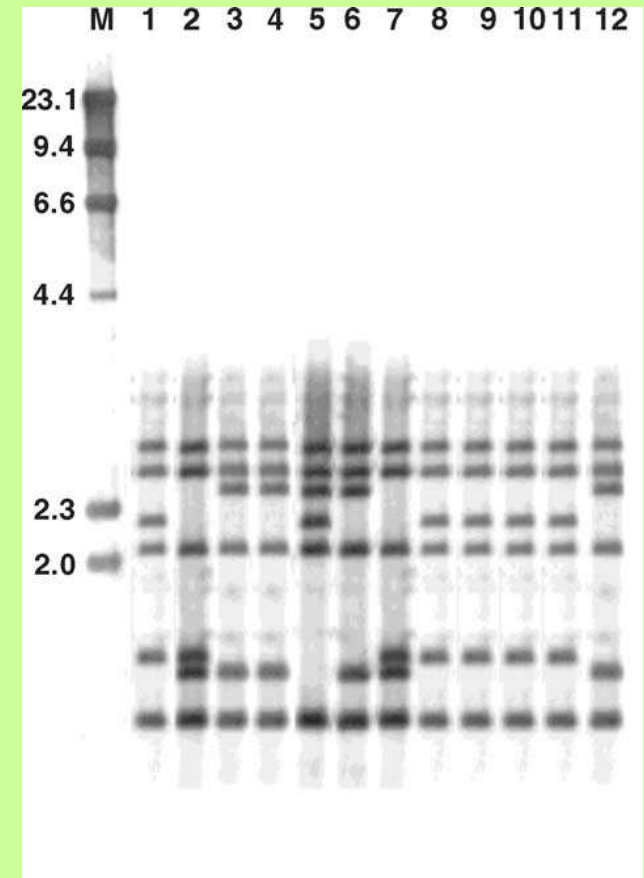


A ještě jeden, komplikovanější úkol



Analyzujte následující spektrum a odhadněte, co se mohlo stát

- 1) Porovnejte vzorek č. 1 a 2
- 2) Najděte další podobné události
- 3) Co je méně pravděpodobné?



Řešení?



Toto jsou možná vysvětlení, zájemci mohou i vypočítat délky změněných úseků

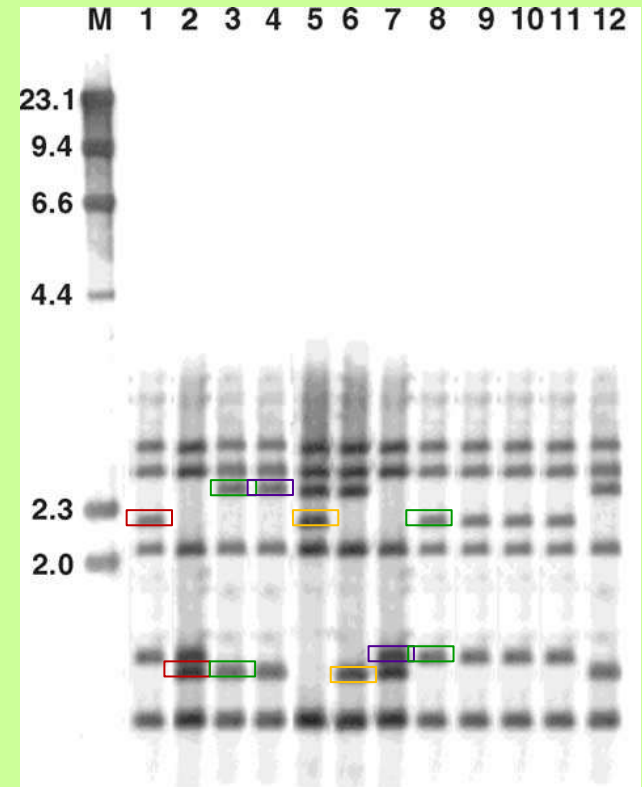
1) U vzorku č. 2 došlo k delecii (nebo u vzorku č. 1 k inzerci) úseku DNA

2a) Podobné mohlo nastat mezi vzorky 3-8 (3-1, apod.) – 2 události!

2b) Další možnost 4-7

2c) A ještě jedna možnost 5-6

3) Dvě události **versus** jedna jsou méně pravděpodobné



Odhadněte evoluci ribotypů



Což třeba takhle

Cfol/4 (serotyp 5)



Cfol/3 (serotyp 3,4,6 a12)



Cfol/2 (serotyp 2,7)



Cfol/1 (serotyp 1,8,9,10 a 11)

serotypy	ribotype patern	ribotype
5	 	Cfol/4
3,4,6,12	 	Cfol/3
2,7	 	Cfol/2
1,8,9,10,11	 	Cfol/1

Řešení?



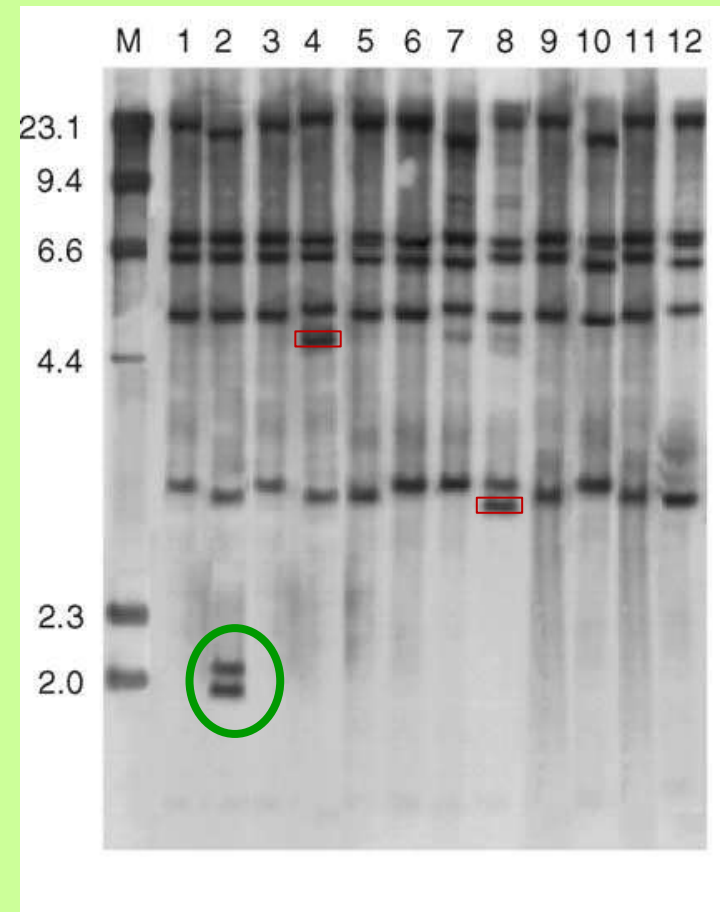
Toto jsou možná vysvětlení, zájemci mohou i vypočítat délky změněných úseků

1) U vzorku č. 4 došlo k deleci (nebo u vzorku č. 8 k inzerci) úseku DNA

2a) U vzorku č. 5 se ztratilo jedno restrikční místo oproti č. 4 (nebo opačně)

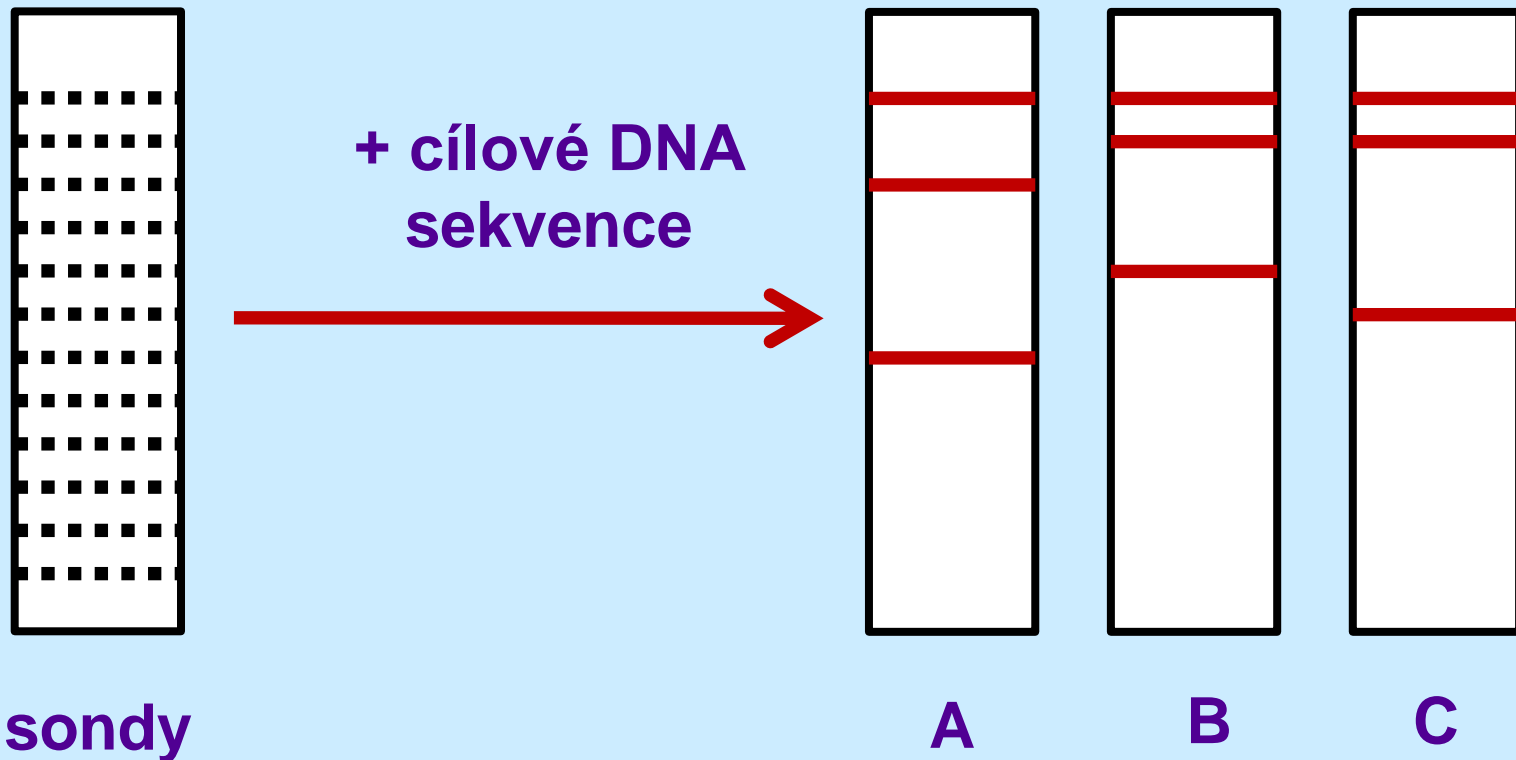
2b) Přibyl/ubyl počet kopií

3) ???



Metoda reverzní hybridizace

- „Sonda“ je nanesena na pevný povrch
- Cílová sekvence je v tekuté fázi, zpravidla ve formě amplikonu po PCR

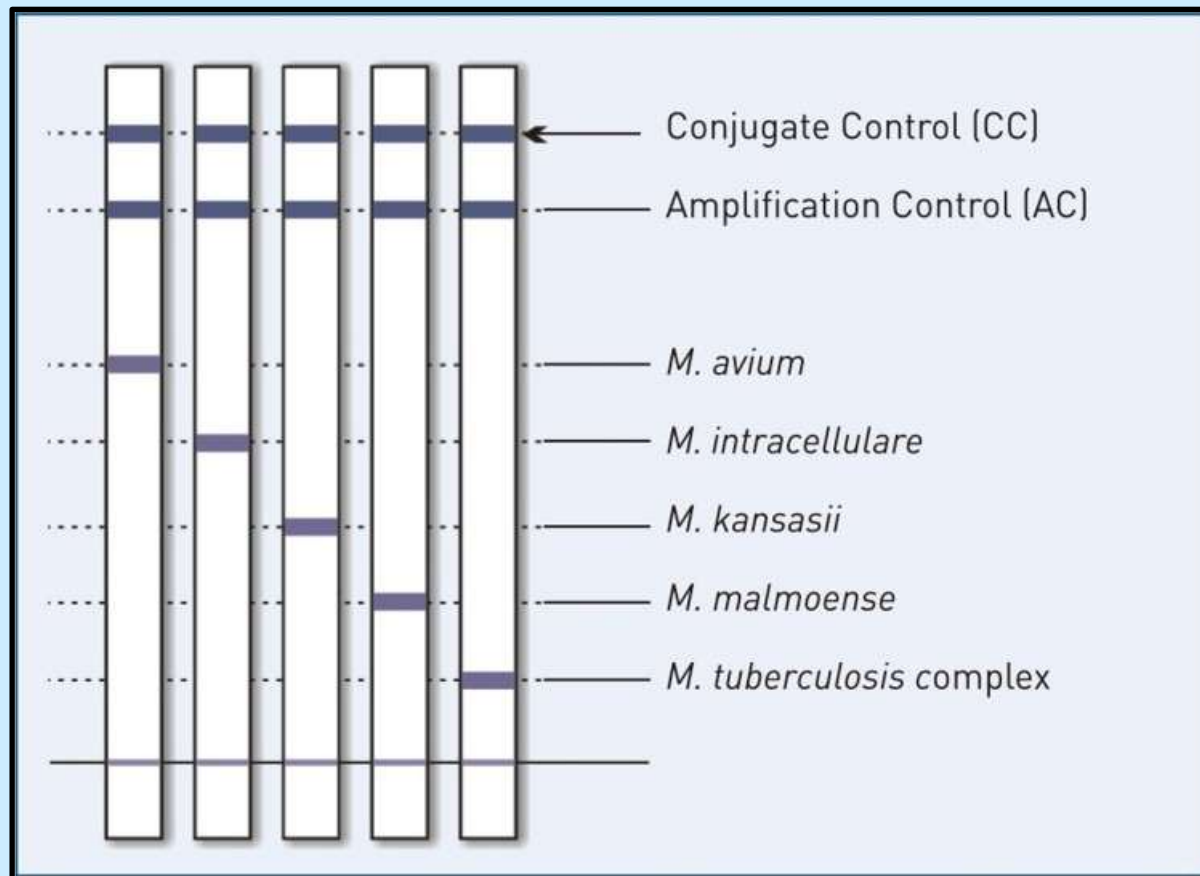


Tři jednoduché kroky

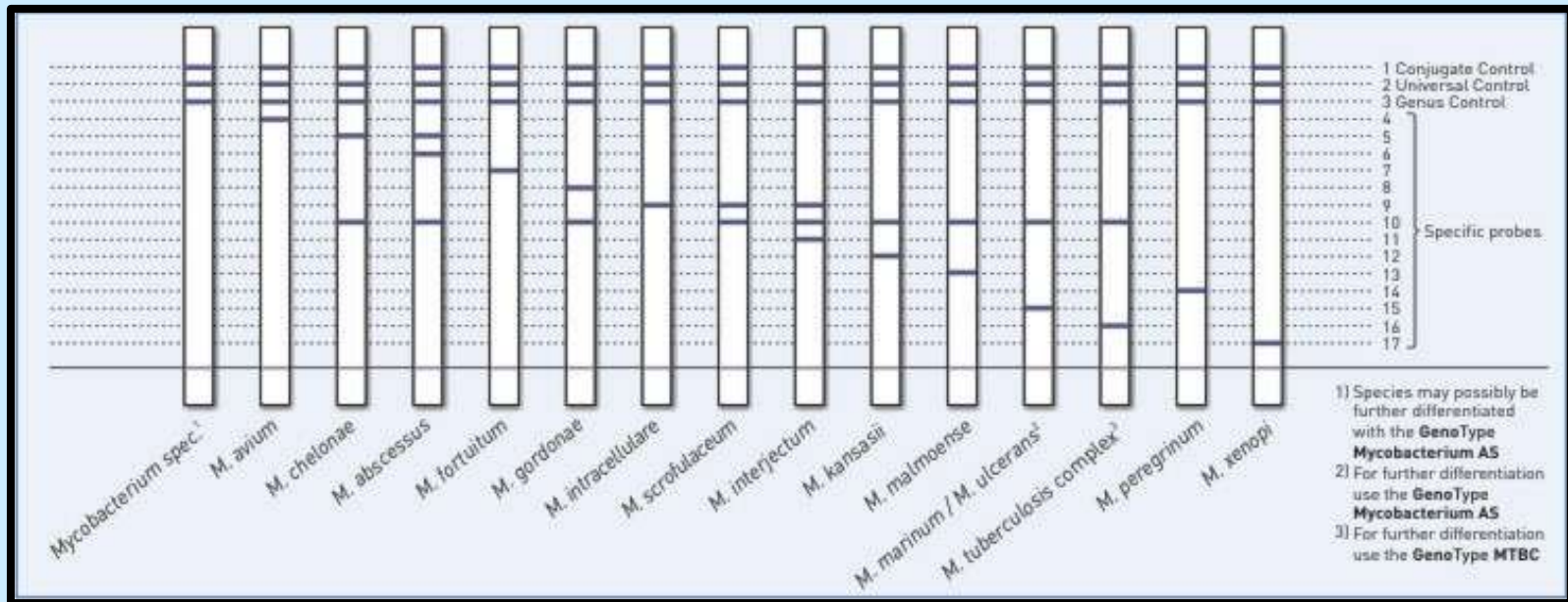
- **Izolace DNA ze vzorku**
- **Amplifikace cílové sekvence (PCR)**
- **Detekce značeného produktu na matrici**



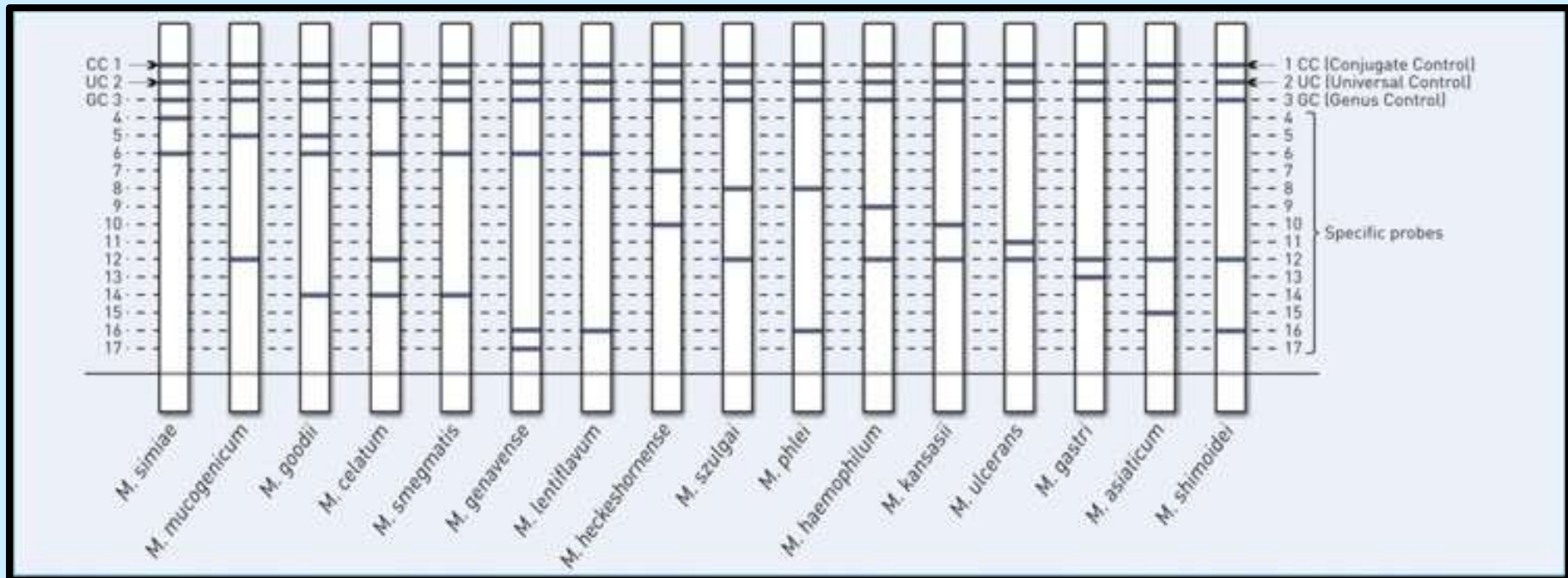
Detekční systémy pro mykobakterie I



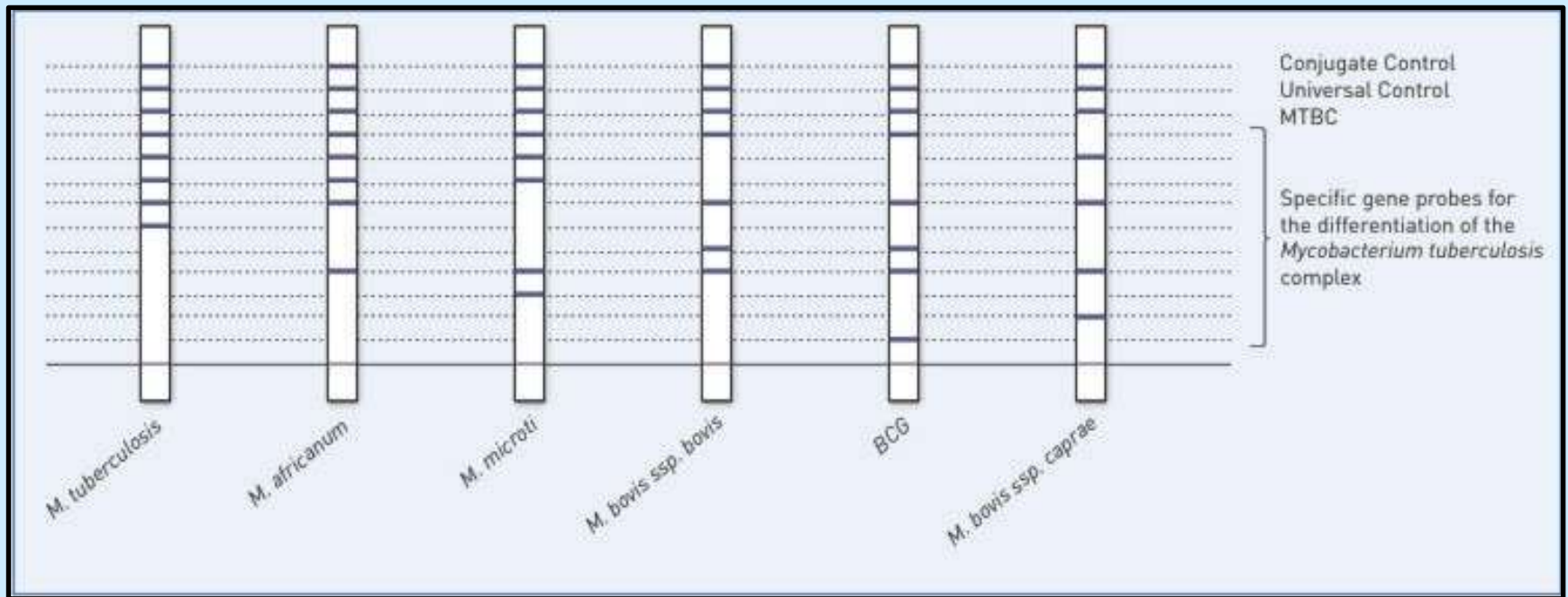
Detekční systémy pro mykobakterie II



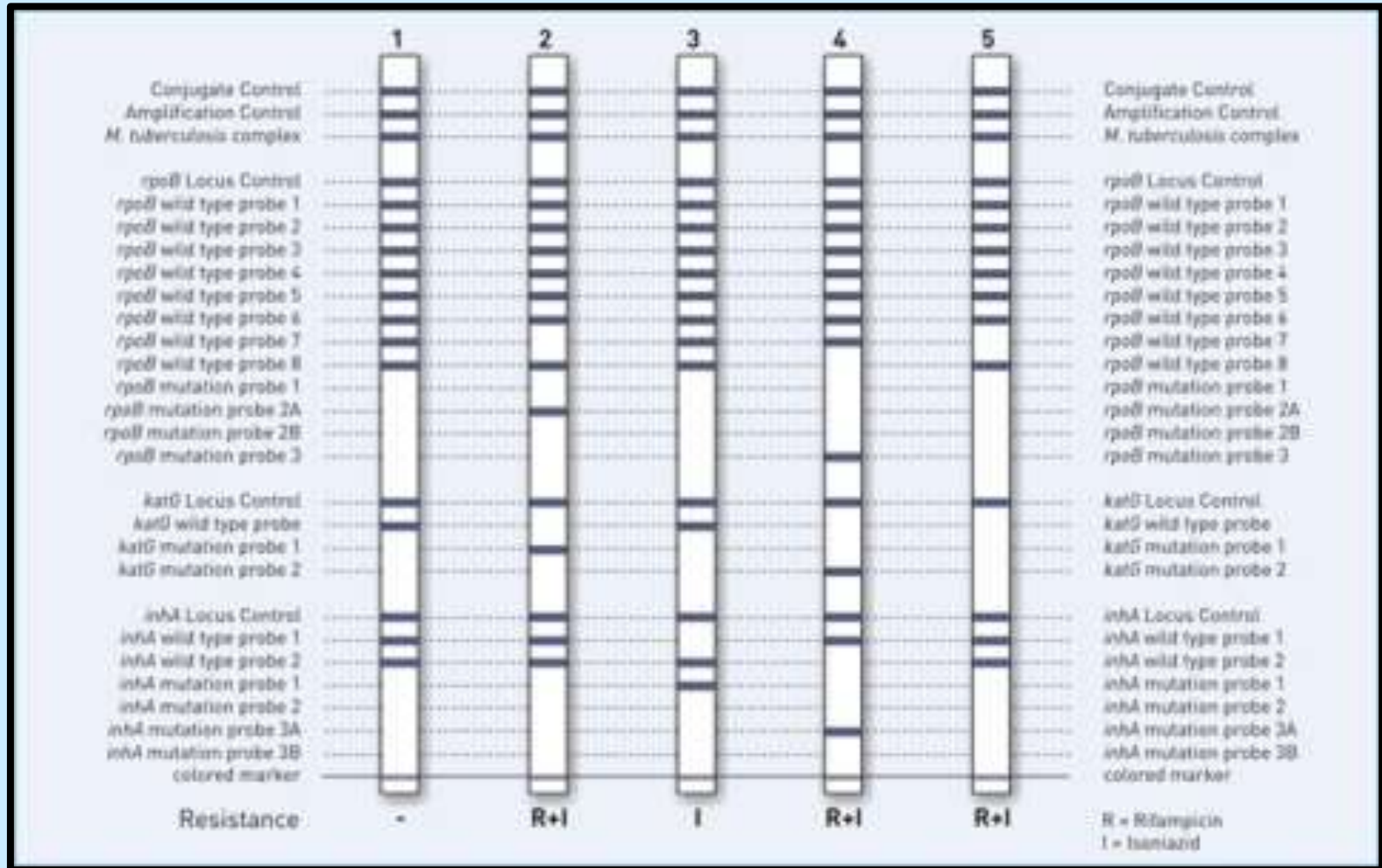
Detekční systémy pro mykobakterie III



Diferenciace zástupců MT komplex



Detekce genů rezistence

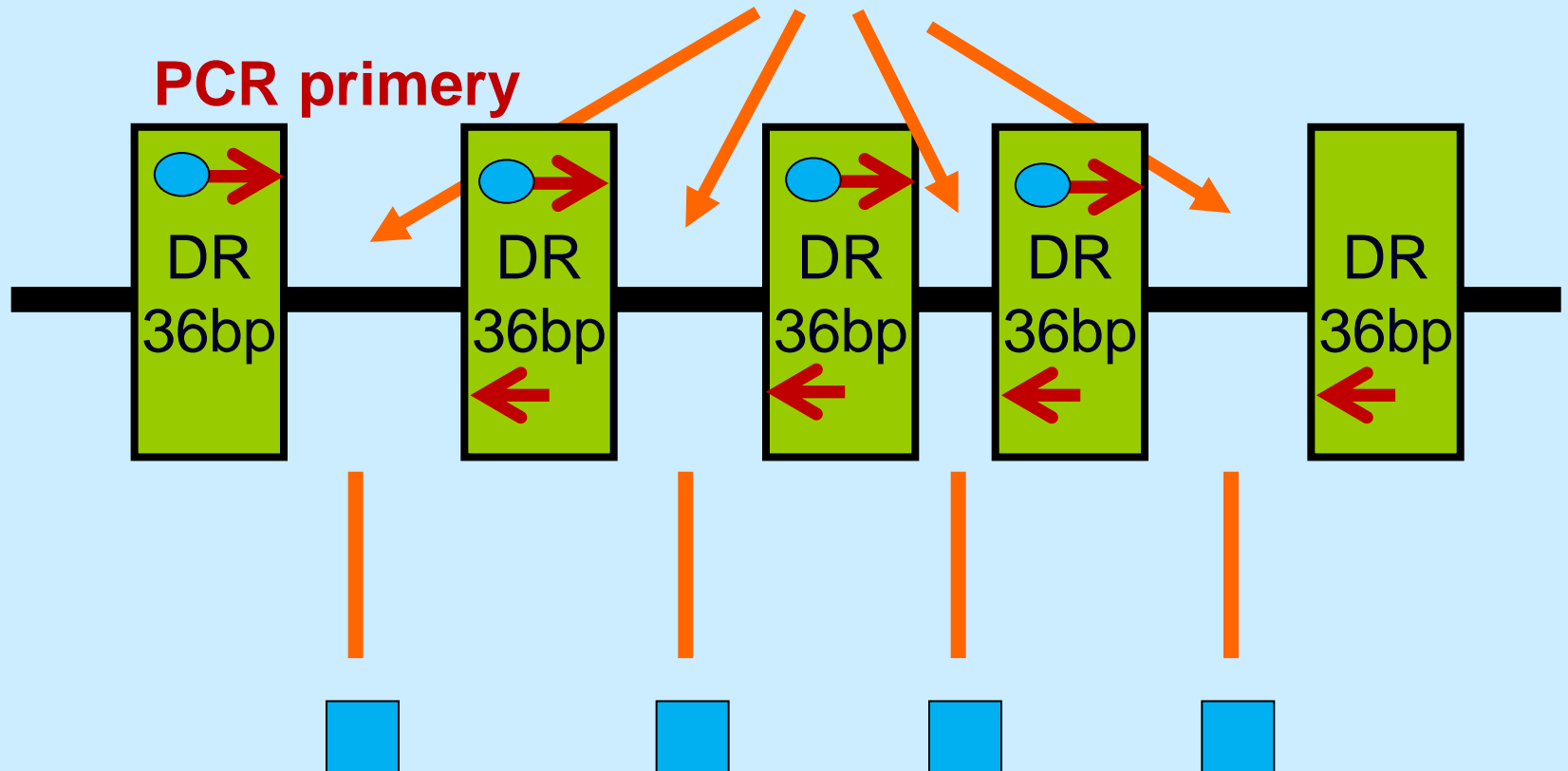


Další systémy

- **Multirezistentní kmeny *Staphylococcus aureus***
- **Detekce *Helicobacter pylori* + rezistence**
- **Detekce *Chlamydia trachomatis***
- **Detekce *Bordetella pertussis* a *B. parapertussis***
- ***Clostridium difficile* – diferenciaci mezi nepatogenními, virulentními a hypervirulentními kmeny**
- **Detekce desítek gram pozitivních a gram negativních druhů**
- **Geny pro Shiga toxin**
- **Vankomycin rezistentní enterokoky**
- **Detekce periodontopatogenních bakterií**

Spoligotypizace

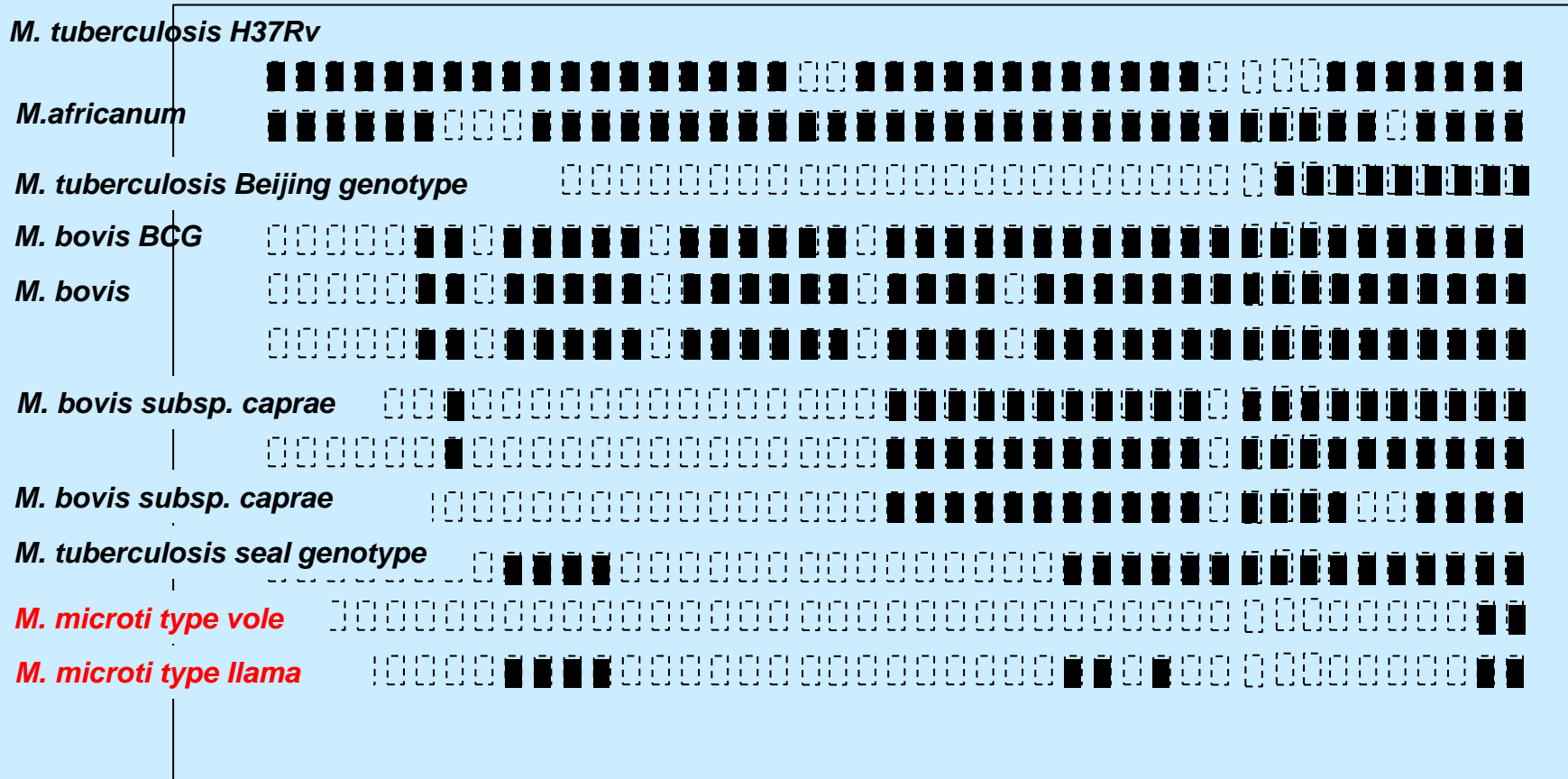
Mezerníky dlouhé 35-41bp



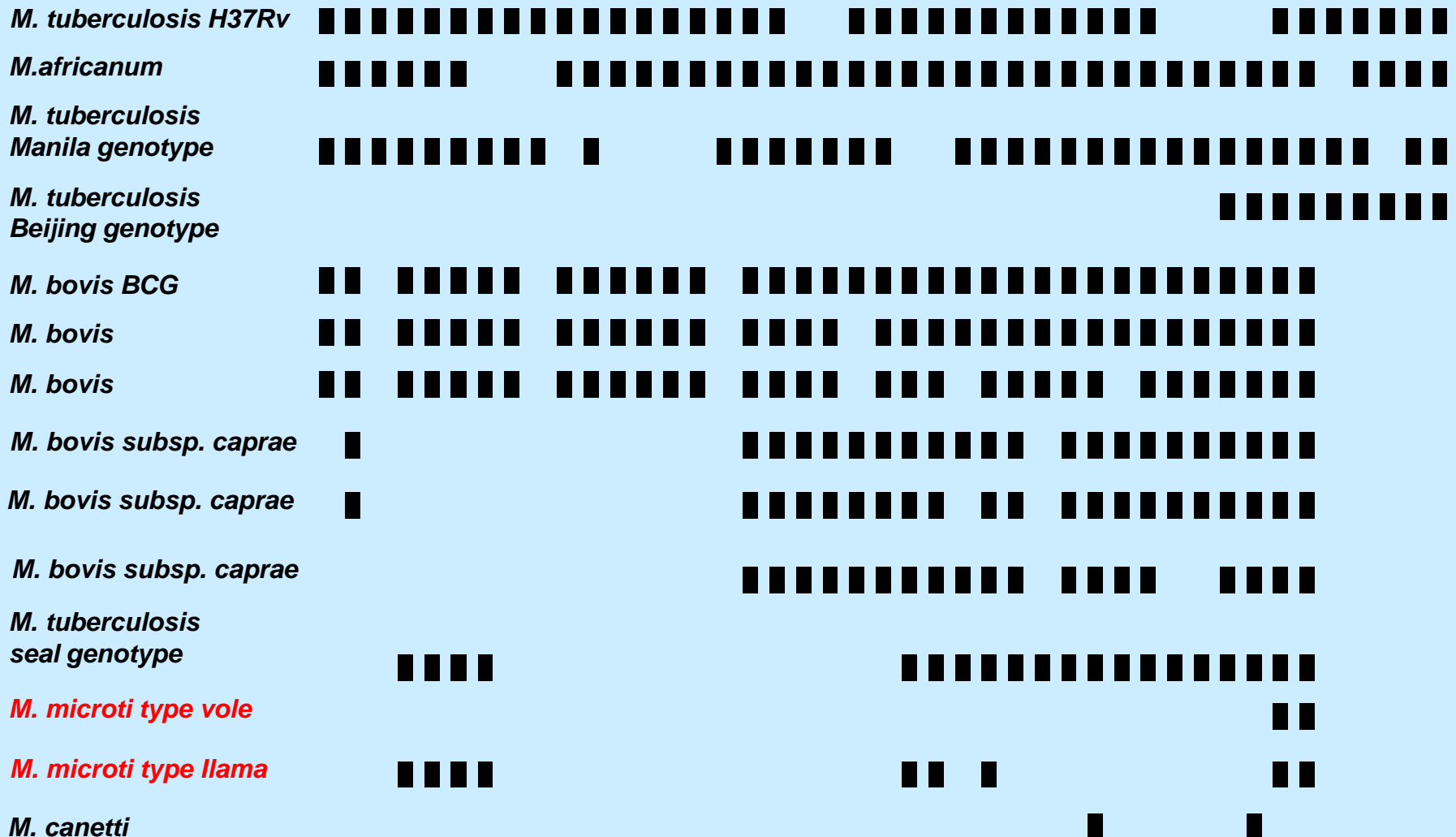
43 specifických oligonukleotidových sond vázaných na membránu

Membrána pro spoligotyping

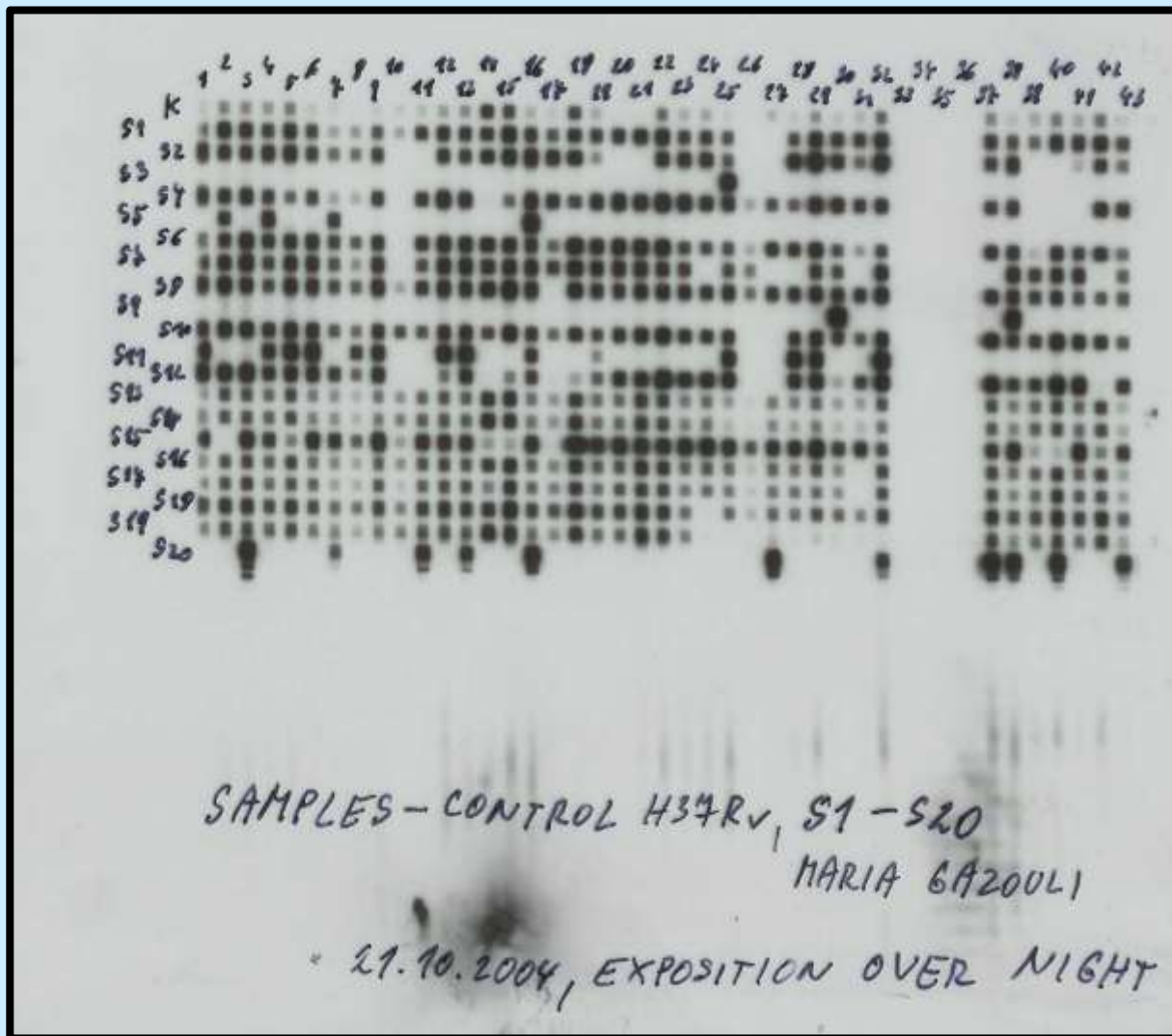
- 1) Membrána se 43 specifickými sondami
- 2) Hybridizuje se s produktem PCR
- 3) Vyhodnotí se výsledky



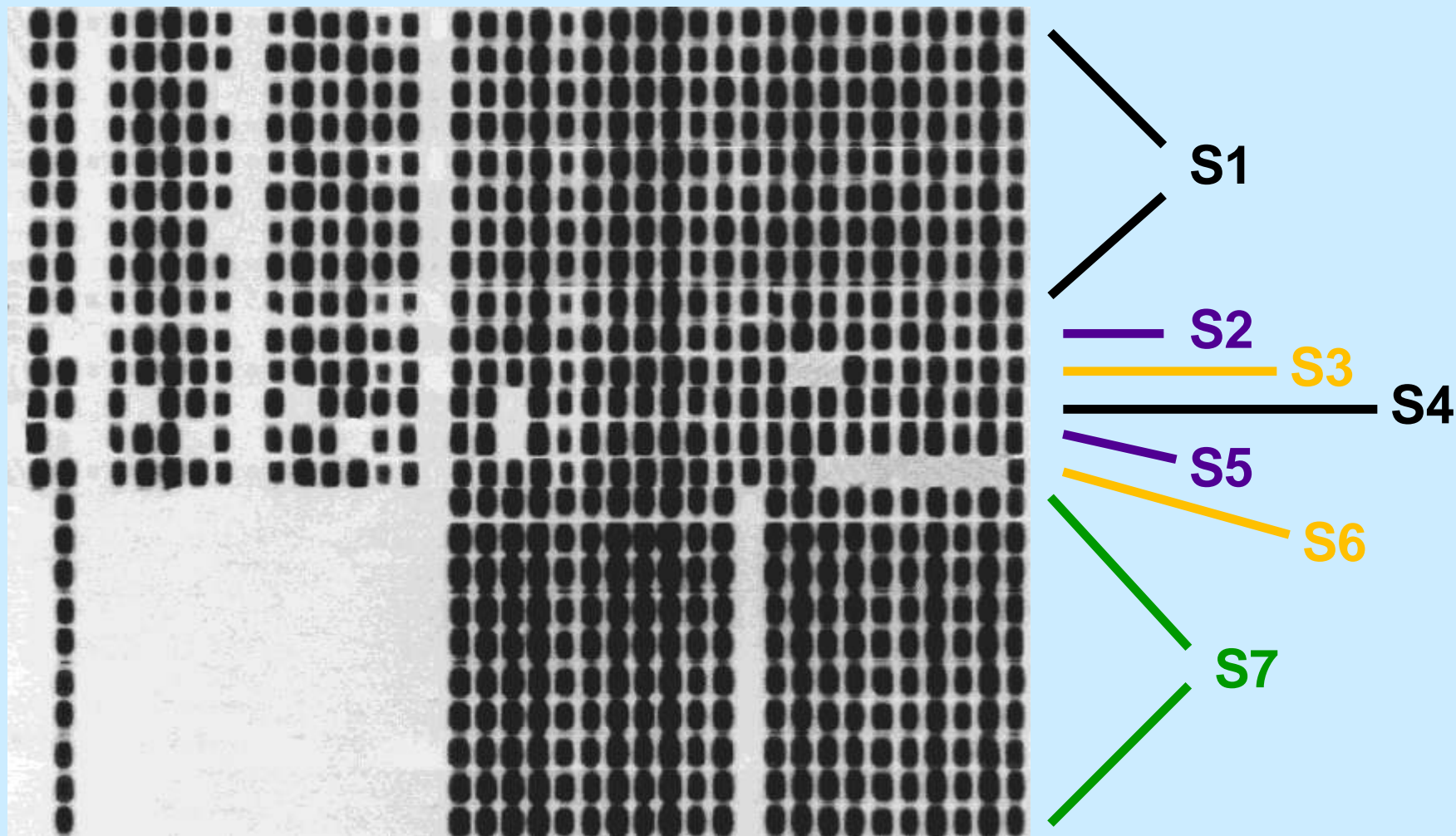
Profily zástupců komplexu *M. tuberculosis*



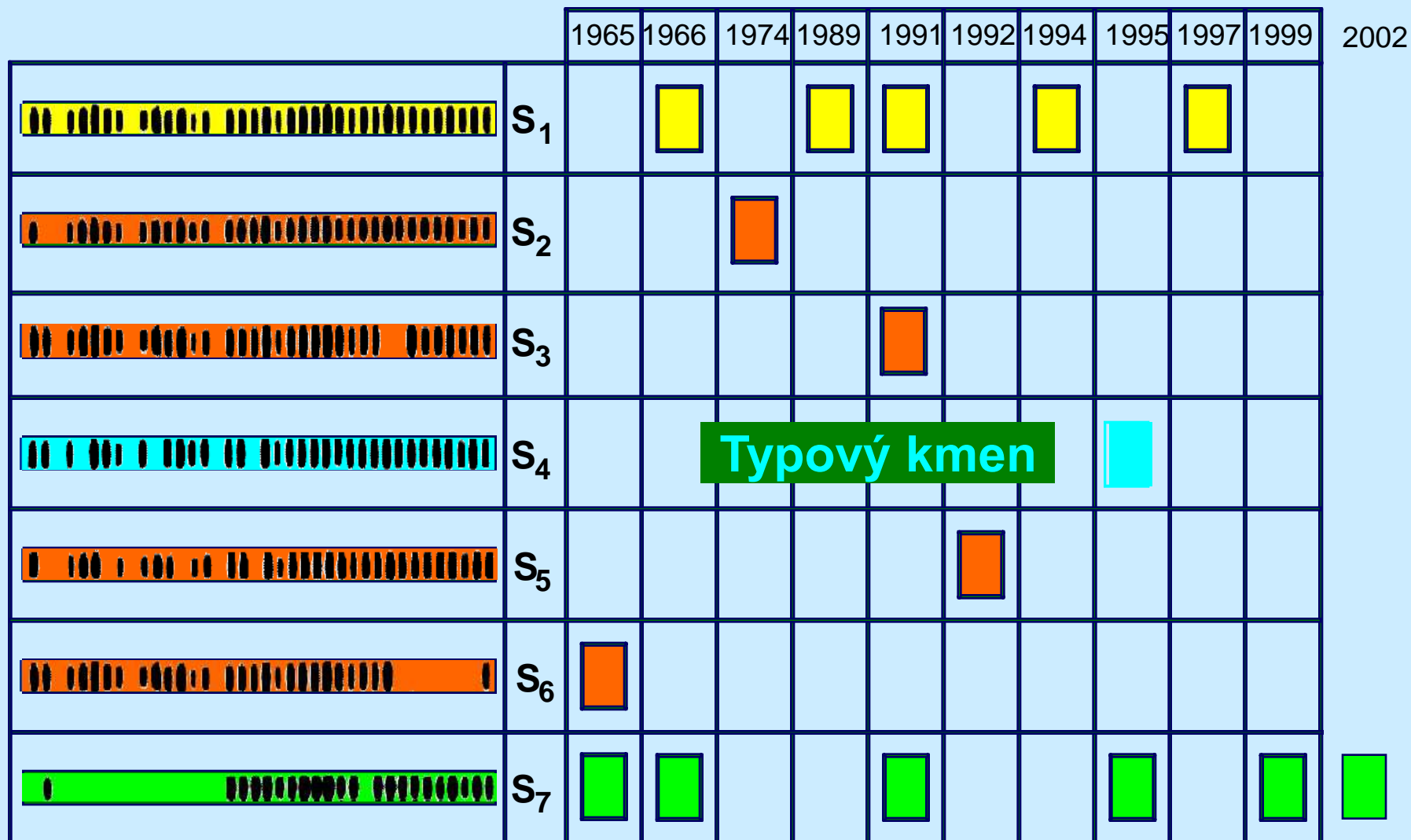
Reálný záznam spoligotypizace



Vyhodnocení spoligotypizace



Profily izolátů *M. bovis* z let 1965-2002

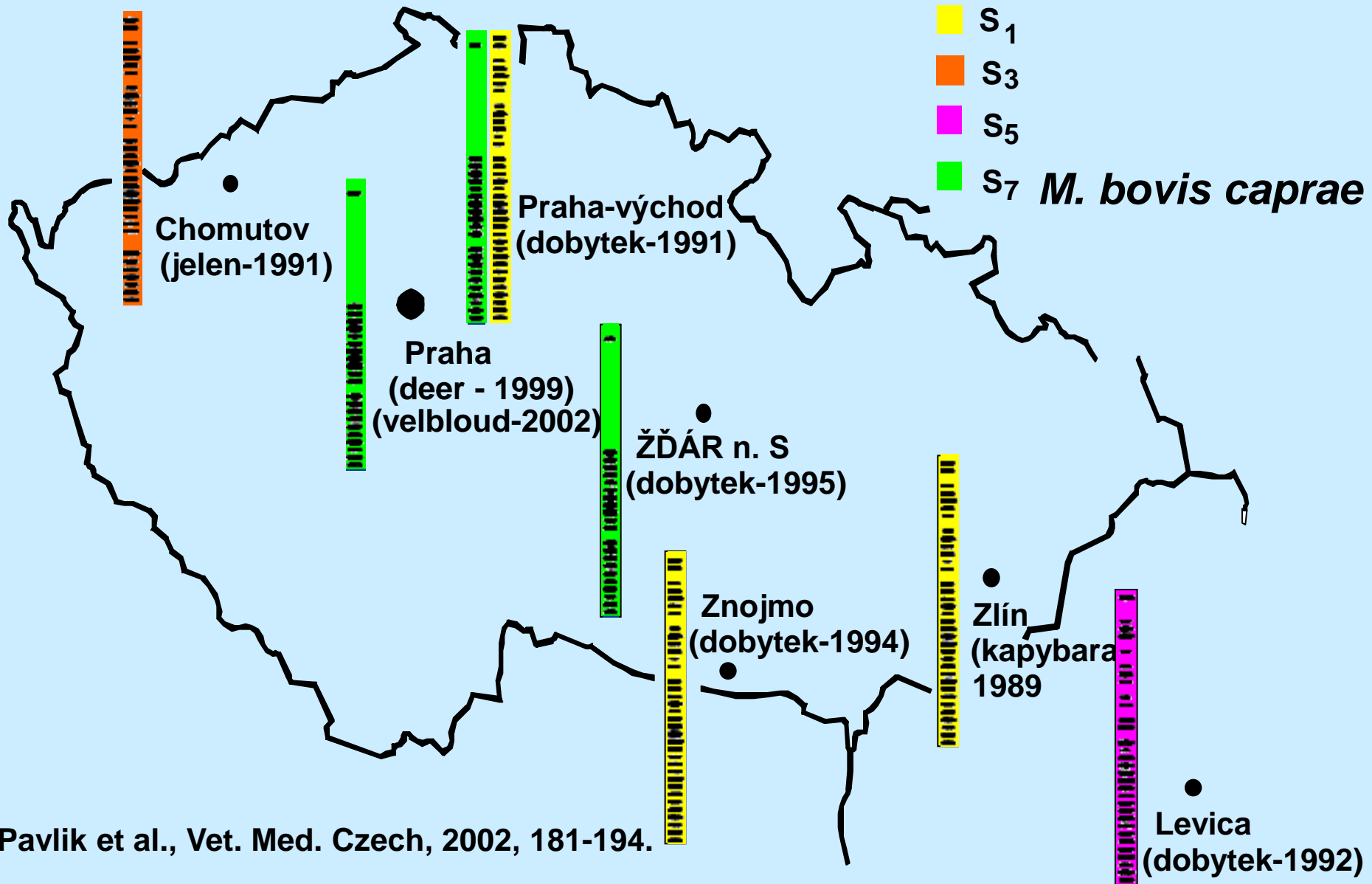


 Nejběžnější typ

 Jedinečný typ

 *M. bovis caprae*

Spoligotypy izolátů *M. bovis* u zvířat



Vyhodnot'te



Proved'te analýzu spoligotypů podle předložené učební pomůcky

Shrnutí

- 1) Způsoby provedení hybridizace**
- 2) Hybridizace v roztoku**
- 3) Příprava značených sond**
- 4) Hybridizace na pevném povrchu**
- 5) Southernův přenos**
- 6) Fluorescentní *in situ* hybridizace**
- 7) Příklady využití metod hybridizace v analýze mikroorganismů – RFLP, reverzní hybridizace, spoligotypizace**