

A talajban található DNS-ek jellemzésére szolgáló módszerek

Szerkesztette:
Wekler Mihály István

A talajban található DNS vizsgálatainak jelentősége

- A talaj nagyon összetett élőhely
- A mikrobiális heterogenitás a talajban felülmúl minden más környezetet: kimutatták, hogy 1 g talaj több ezer faj akár 10 milliárd egyedét is tartalmazhatja!
- A talaj genetikai sokfélesége még tartogat meglepetéseket, és gazdag forrása lehet ipari jelentőségű enzimek, bioaktív anyagok felfedezésének.
- A mikrobafajok nagy része, melyek a talajban találhatóak nem kellően feltérképezettek, ugyanis számos mikroorganizmus nem szaporítható laboratóriumi körülmények között.

A DNS talajmintából való kinyerésének nehézségei

- Standard kultivációs technikákkal a mikrobiális diverzitás max 1%-a nyerhető vissza, noha pl. talajban akár több, mint 10 000 különböző faj is jelen lehet
→Komoly problémát jelent, hogy az *in situ* megfigyelhető mikróba sokféleség, és a szaporító tápon *in vitro* számolható telepszámok - számlálási anomáliák - között eltérés mutatkozik
- A DNS kinyerése során huminsavak is extrahálódnak, melyek gátolják a molekuláris munkákat

A DNS kinyerése talajmintából

A DNS kinyerésére talajmintából kétféle extrakciós módszert dolgoztak ki:

- A sejtek **direkt lízise**, és ezáltal a DNS közvetlen kinyerése - a környezeti mintától nem választják el a sejteket. Sok DNS kinyerését lehetővé tévő, egyszerű extrakciós eljárás.
- **Indirekt módszer:** először elválasztják a környező anyagoktól a sejteket, és utána extrahálják a DNS-t a tisztított (utána akár laborban felszaporított) sejtekből - tiszta, nagyon jó integritású DNS.

A céltól függően, használható a két módszer egyike, pl. egy egyedi enzimet kódoló gén kinyeréséhez alkalmazható az első megoldás, míg multifunkciós enzimeket kódoló géncsoportok izolálásához célszerű a második módszert használni.

Direkt lízis

- Az adott környezet összes mikroorganizmusának teljes genomját izolálják és klónozzák egy gazdába (pl. *E. coli*) a további vizsgálatokhoz
- A sejteket nem választják el a környezeti mintából, líziséket a DNS tisztítása követi
- A sejtek lízisére magas hőmérsékletet, erős detergenset, mechanikai törést vagy fagyasztás-olvasztás módszert alkalmazható
- Jobban reprezentálja a minta valós mikrobiális sokféleségét
- Leggyakrabban ezt használják, mivel sokféle talajra alkalmazható, kevésbé laborigényes, több DNS nyerhető
- Hátránya: kisebb DNS fragmentek keletkeznek

Indirekt módszer

- Először elválasztják a környezeti minta anyagaitól a sejteket (ezután gyakran felszaporítják), és utána extrahálják a DNS-t
- A jelenlévő mikrobáknak csak egy részét lehet szelektálni és szaporítani tiszta kultúrában. A szaporítható mikroorganizmusok jellemezhetőek, fermentálhatóak
- Tiszta, nagyon jó integritású DNS nyerhető.
- Olyan talajminták esetén előnyös, ahol nagy mennyiségű olyan anyagot találunk, amelyek zavarják a DNS izolációt (pl. huminsavak)
- Nagyobb DNS fragmentek, nagyinszert könyvtár készítésére alkalmas

Példa a direkt lízises extrakcióra

UltraClean® Soil DNA Isolation Kit



- Tartalmazza az előkészített lízáló reagenseket
- PCR inhibitorokat kizáró eljárás
- Kiszűri a vizsgálatokat nehezítő összetevőket

A DNS előkészítése vizsgálathoz

Polimeráz-láncreakció (PCR-Polimerase Chain Reaction):

A kinyert DNS megsokszorozását teszi lehetővé.

- A DNS két szálát szétválasztják – hevítés hatására a bázisokat összekötő hidrogén-kötések felbomlanak → *denaturálás (denaturation)*
- Primerekkel (rövid, mesterséges DNS szálak) megjelölik a sokszorozandó DNS-szakaszt (*annealing*)
- DNS-polimeráz végigmegy a primerek által megjelölt szakaszon és duplikálja azt → *meghosszabbítás (elongation)*

A DNS fragmentek elválasztása, vizsgálata

A DNS darabok elválasztására használt legáltalánosabb módszer az agaróz gél elektroforézis, amely a DNS molekulák elektroforetikus vándorlási sebesség-különbségén alapul.

→ probléma, hogy a PCR-rel feldúsított DNS minták molekulamérete közel áll egymáshoz, ezért ez az eljárás nem tudja megfelelően elkülöníteni a különböző DNS láncokat

Megoldás: Denaturáló grádiens gélelektroforézis (DGGE)

Denaturáló grádiens gélelektroforézis (DGGE)

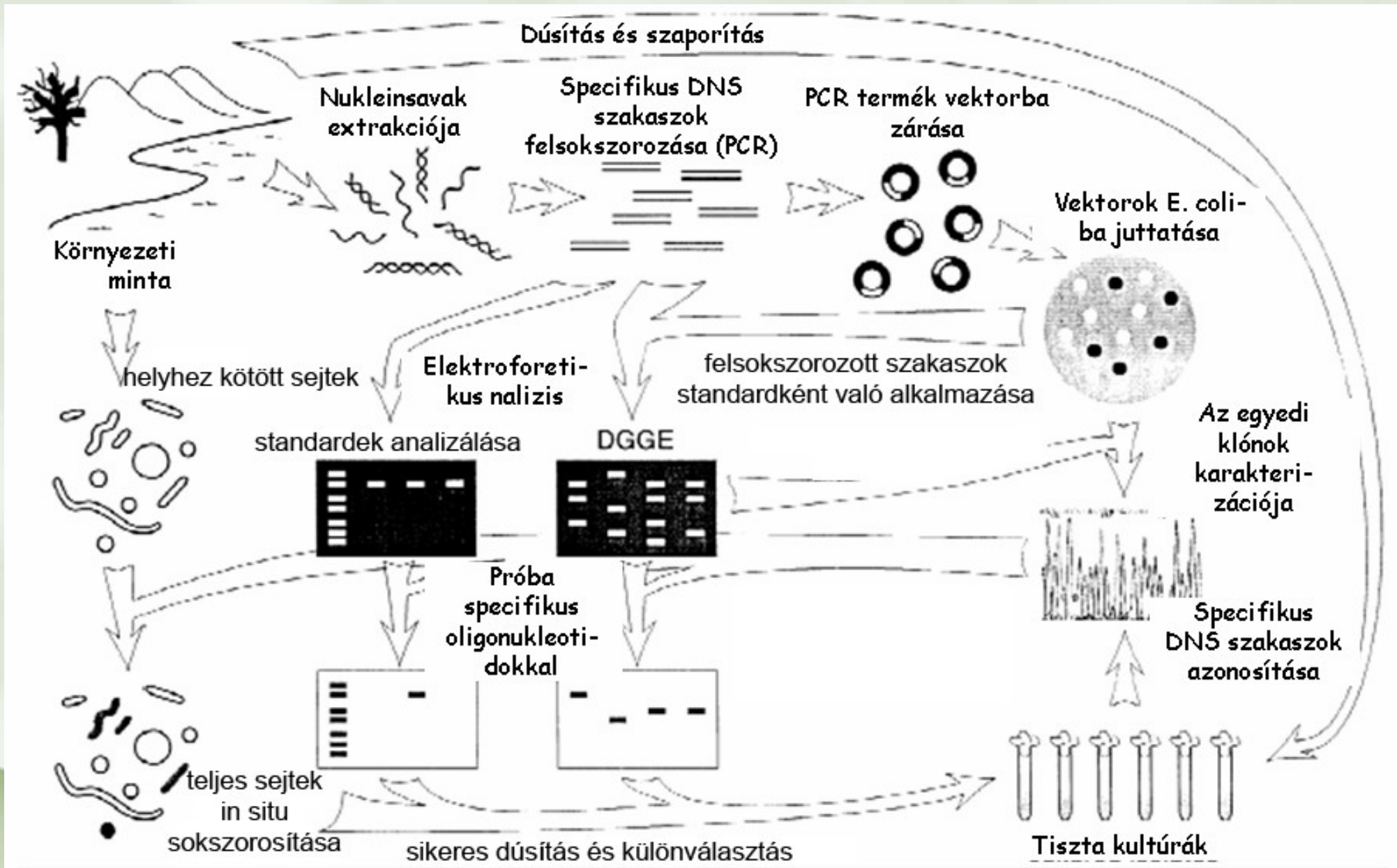
A DGGE módszer a kétszálú DNS egy fontos fizikai tulajdonságán, az olvadási hőmérsékleten alapul, mely a DNS bázisösszetételétől függ.

A DGGE során az előzetesen PCR-rel felszaporított DNS poliakrilamid denaturáló grádiens gélben vándorolva részlegesen „megolvad”. A részlegesen felnyílt DNS darabok mobilitása nagymértékben lecsökken.

Ez azonos méretű, de különböző bázisösszetételű fragmentek esetén eltérő futási magasságban történik.

Tehát a DGGE a különböző DNS-ek elválasztását azok eltérő denaturálódásának segítségével valósítja meg.

A talajban található DNS vizsgálatainak áttekintése



Források:

<http://www.eeescience.utoledo.edu/faculty/sigler/research/protocols/dgge/dgge.pdf>

<http://www.bio-science.hu/products.php?p=37>

<http://hu.wikipedia.org/wiki/PCR>

<http://www.mobio.com/soil-dna-isolation/ultraclean-soil-dna-isolation-kit.html>

Források:

http://www.moez.fraunhofer.de/en/Images/UniversittPecs_tcm102-12514.pdf

<http://www.taki.iif.hu/talajbio/at1.pdf>

http://biotech.szbk.u-szeged.hu/KatiKornytudNappaliea/master/Bioremed/9_oras.ppt

<http://oktatas.ch.bme.hu/oktatas/konyvek/mezgaz/dnsklon/laborgyak/gelefo.pdf>