

ANNA RASZKA, ALEKSANDRA ZIEMBIŃSKA, ANNA WIECHETEK*

METODY I TECHNIKI BIOLOGII MOLEKULARNEJ W BIOTECHNOLOGII ŚRODOWISKOWEJ

MOLECULAR BIOTECHNOLOGY TECHNIQUES AND METHODS IN ENVIRONMENTAL BIOTECHNOLOGY

Streszczenie

W ostatnich latach pojawiło się dużo różnorodnych metod pozwalających na analizę składu biocenozy oraz rozmieszczenia przestrzennego mikroorganizmów. Metody molekularne górują nad tradycyjnymi technikami, gdyż nie są uzależnione od hodowli mikroorganizmów na podłożach mikrobiologicznych. Jest to ważna cecha metod analitycznych, ponieważ przyspiesza to całą procedurę badawczą. Dodatkowo metody oparte na analizie materiału genetycznego charakteryzują się dużą czułością i powtarzalnością. W artykule opisano metody najczęściej wykorzystywane w biotechnologii środowiskowej.

Słowa kluczowe: reakcja PCR, elektroforeza, klonowanie DNA, sekwencjonowanie DNA, hybridyzacja DNA, białka GFP

Abstract

During last several years a wide variety of methods useful in the analyzing of biocenosis' composition and spatial microorganisms distribution appeared. A significant aspect of molecular techniques usage is its independence from traditional microbiological methods. It is an important analytical feature, because it enables a speedier research. Additionally, methods based on genetic material are more sensitive and repeatable. This article contains the description of the techniques of the most commonly used in environmental biotechnology.

Keywords: PCR, electrophoresis, DNA cloning, DNA sequencing, DNA hybridization, GFP

* Dr inż. Anna Raszka, dr Aleksandra Ziemińska, mgr Anna Wiechetek, Katedra Biotechnologii Środowiskowej, Wydział Inżynierii Środowiska i Energetyki, Politechnika Śląska.

1. Wstęp

Zgłębianie tajników wielu dziedzin naukowych jest z racji przyspieszonego rozwoju technik badawczych oparte na analizie ich najbardziej elementarnych podstaw. Dzięki udoskonaleniu metod analitycznych w dziedzinach składających się na tę interdyscyplinarną gałąź wiedzy biotechnologia środowiskowa ma szansę na szybki rozwój. W badaniach biotechnologii środowiskowej na szczególną uwagę zasługują metody biologii molekularnej, które pozwalają na poznawanie procesów biologicznych wykorzystywanych w skali technologicznej na poziomie materiału genetycznego.

Zakres zagadnień, jakie obejmuje biotechnologia środowiskowa dotyczy zastosowania biotechnologii (a więc technologii, których sercem jest metabolizm mikroorganizmów) w ochronie i inżynierii środowiska. Dotyczy zatem m.in. oczyszczania różnego rodzaju ścieków i unieszkodliwiania powstających odpadów. Istotą technologii wykorzystywanej do eliminacji zanieczyszczeń stanowią bakterie (najczęściej, ale mogą to także być inne organizmy, np. grzyby), które są wyposażone w odpowiedni aparat enzymatyczny zdolny do biotransformacji lub biodegradacji zanieczyszczeń zawartych w ściekach lub w odpadach. Ze względu na zróżnicowany skład ścieków lub odpadów i ich niejednorodność, charakteryzującą się zmiennością zarówno co do rodzaju zawartych zanieczyszczeń, jak i ich stężeń, często niezbędne jest współdziałanie co najmniej kilku różnych gatunków mikroorganizmów. Zatem wykorzystuje się tutaj nie czyste szczepy bakteryjne (jak np. w biotechnologii farmaceutycznej), ale kultury mieszane.

W ostatnich latach pojawiło się dużo różnorodnych metod umożliwiających analizę składu biocenozy oraz rozmieszczenia przestrzennego mikroorganizmów wewnątrz skupisk, takich jak np. kłaczkosady czynnego czy błona biologiczna, co pozwala na zbadanie ich właściwości i funkcjonowania. Nowo dostępna wiedza jest efektywnie wykorzystywana do tworzenia i doskonalenia modeli matematycznych sterujących konkretnym procesem biologicznym. Pomimo ogromu możliwości, jakie dają techniki molekularne, wielu sceptyków neguje ich przydatność w ochronie środowiska, argumentując swoje stanowisko zbędnością prowadzenia badań jedynie do poziomu biologii komórki. Nasuwa się uwaga, czy nie lepiej i ekonomiczniej jest wprowadzać więcej danych i sprawdzonych parametrów do tworzonych modeli matematycznych, aniżeli doświadczalnie modyfikować model?

Metody molekularne mają istotną przewagę nad tradycyjnymi technikami, gdyż nie są uzależnione od hodowli mikroorganizmów na podłożach mikrobiologicznych. Jest to ważna cecha, która pozwala na przyspieszenie procedury badawczej. Dodatkowo metody oparte na analizie materiału genetycznego charakteryzują się dużą czułością i powtarzalnością.

Celem artykułu nie jest przedstawienie czytelnikowi szczegółowych opisów omawianych metod molekularnych stosowanych w biotechnologii środowiskowej, ale jedynie zapoznanie z ich możliwościami i wymaganiami w stosowaniu. Dostępność metod biologii molekularnej jest obecnie dość szeroka i często wybór odpowiedniej techniki oraz dotarcie do polskojęzycznych podstaw teoretycznych może stanowić jedną z pierwszych trudności. W związku z tym niniejszy artykuł może posłużyć jako pomoc inżynierom (i nie tylko), którzy rozpoczynają badania opierające się na zdobyczach dotychczasowej wiedzy z zakresu biologii molekularnej.

2. Metody i techniki molekularne wykorzystywane w biotechnologii środowiskowej

Wśród technik biologii molekularnej najczęściej stosowanych w badaniach biotechnologicznych, których celem jest analiza stanu określonego środowiska, wymienić można: reakcję łańcuchową polimerazy (PCR), elektroforezę żelową i jej odmiany, klonowanie fragmentów DNA, sekwencjonowanie DNA, hybrydyzację typu Southern Blot, hybrydyzację typu Northern Blot, hybrydyzację *in situ*, FISH, białka GFP, mikromacierze DNA.

2.1. Reakcja łańcuchowa polimerazy (PCR) [1–5]

Reakcja łańcuchowa polimerazy, zwana PCR (ang. *DNA Polymerase Chain Reaction*), pozwala na szybkie powielenie wybranego odcinka kwasu nukleinowego. Jest to metoda bardzo czuła i wydajna, a dzięki swej prostocie uważana obecnie za najważniejsze narzędzie biologii molekularnej. W ciągu kilku godzin można namnożyć 10^6 – 10^9 kopii fragmentów wyjściowego DNA. Przed przeprowadzeniem reakcji PCR przygotowuje się mieszaninę reakcyjną składającą się z: materiału przeznaczonego do powielenia, który zwany jest matrycowym DNA, pary starterów (ang. *primer*), deoksynukleotydów (deoksynukleozydo-trifosforanów dNTP), enzymu termostabilnej polimerazy DNA oraz buforu. Startery stanowią fragmenty DNA, które są komplementarne do sekwencji flankujących poszukiwany odcinek DNA. Startery najczęściej dobiera się na podstawie danych zamieszczonych w literaturze przedmiotu lub konstruuje na podstawie sekwencji dostępnych w banku genów.

Następnie mieszanina reakcyjna jest cyklicznie (25–40 cykli) ogrzewana do temperatury zależnej od fazy cyklu. Każdy cykl składa się z denaturacji (ang. *denaturation*), hybrydyzacji ze starterami (ang. *annealing*) i wydłużania łańcucha DNA (ang. *elongation*). Podczas denaturacji w wyniku działania wysokiej temperatury DNA zostaje rozplecione do pojedynczych nici, które w kolejnym etapie hybrydują z parą starterów. Następnie polimeraza DNA odbudowuje na każdej z nici brakujący, komplementarny odcinek DNA, zaczynając od jego miejsca 3'. Przyłączanie powtarza się w każdym cyklu reakcji, a w efekcie otrzymujemy powielony fragment znajdujący się pomiędzy starterami. Każdy z etapów cyklu charakteryzuje inna temperatura, dlatego reakcję PCR przeprowadza się w urządzeniu zwanym termocyklerem, które jest minicieplarką, gdzie zmiana temperatury o kilkadziesiąt stopni następuje w ciągu kilku sekund. Podczas pierwszego cyklu z każdego jednoniciowego odcinka DNA powstaje kolejny fragment, tak więc po pierwszym cyklu liczba fragmentów ulega podwojeniu, w kolejnym ilość DNA jest czterokrotnie większa itd.

Najważniejszą zaletą reakcji PCR jest możliwość otrzymania wielu kopii fragmentów genów z niewielkiej ilości materiału genetycznego. Produkty reakcji PCR stanowią podstawę do dalszych analiz technikami elektroforetycznymi i do sekwencjonowania, które w wypadku prób środowiskowych, gdzie mamy do czynienia z mieszaniną organizmów, musi być poprzedzone klonowaniem.

Należy mieć także na uwadze, że zastosowanie metody PCR do próbek środowiskowych może się wiązać z przeszkodami wynikającymi z obecności inhibitorów, które mogą powodować osłabienie lub całkowite zahamowanie reakcji amplifikacji. Inhibitorami mogą być związki nieorganiczne i organiczne różnego pochodzenia (np. polisacharydy, mocznik lub kwasy humusowe) [3].

Istnieje co najmniej kilka modyfikacji reakcji PCR, dających nowe możliwości badawcze (tab. 1).

2.2. Elektroforeza żelowa [1, 5–7, 10]

Techniki elektroforetyczne wykorzystują zdolność migracji cząsteczek białek lub kwasów nukleinowych w żelach. Zarówno białka, jak i kwasy nukleinowe mają silny ładunek ujemny, wobec czego w polu elektrycznym przemieszczają się w kierunku od anody do katody. Stosowane w badaniach żele stanowią włóknistą sieć, która ogranicza swobodną migrację. Szybkość przemieszczania się białka czy DNA/RNA w żelu zależy od ładunku, wielkości i kształtu cząsteczki. Najszybciej poruszają się cząsteczki małe i nierozgałęzione. W zależności od rodzaju zastosowanego żelu (agarozowy lub poliakrylamidowy) i jego stężenia zmienia się zakres rodzaju cząsteczek, które można rozdzielić.

W żelu agarozowym rozdzielić można cząsteczki o wielkości 5–5000 pz (par zasad), z zastrzeżeniem, że w porównaniu z żelem poliakrylamidowym siła rozdzielania jest stosunkowo niska. W tym ostatnim bardzo dokładnie rozdzielane są cząsteczki od 50 do 1500 pz. Jednak praca z poliakrylamidem jest trudniejsza (żele są cieńsze i szybciej polimeryzują), a sam związek jest silną neurotoksyną. Istnieje kilka odmian elektroforez (tab. 2) ważnych z punktu widzenia badań nad mikroorganizmami w postaci czystych szczepów i mieszanin.

Tabela 1

Modyfikacje reakcji PCR

„nested PCR”	Tak zwany „gniazdowy” PCR (inne nazwy to także zagnieżdżony lub wewnętrzny PCR) polega na przeprowadzeniu zwykłej reakcji PCR, a następnie powtórne przeprowadzenie reakcji PCR z drugą parą starterów (determinujących własny profil termiczny), które zlokalizowane są bliżej środka powielanego fragmentu DNA. Pozwala to na zwiększenie specyficzności wyniku [8].
„Multiplex PCR”	Modyfikacja polegająca na namnażaniu jednocześnie kilku fragmentów DNA, używając w tej samej reakcji kilku par starterów. Technika pozwala przyspieszyć badanie większych obszarów DNA z jednoczesną kontrolą poprawności prowadzonego procesu.
PCR w czasie rzeczywistym (ang. <i>real-time</i> PCR)	Reakcja PCR w czasie rzeczywistym to reakcja amplifikacji DNA, którego ilość jest monitorowana podczas przebiegu reakcji dzięki obecności w mieszaninie reakcyjnej barwników lub sond fluorescencyjnych. Barwniki, łącząc się z kwasem nukleinowym, emitują sygnał fluorescencyjny proporcjonalny do ilości produkowanego DNA [2]. Do zalet tej techniki należą duża czułość oraz szybkość wykonania. Jej zastosowanie pozwala na określenie względnej i bezwzględnej ilości matrycy, pomiar poziomu ekspresji genu, określenie liczby kopii genu i rozróżnianie alleli.
RT-PCR (ang. <i>Reverse transcriptase</i> PCR)	Odmiana PCR, w której matrycą jest mRNA. Do namnażania mRNA używa się enzymu zwanego odwrotną transkryptazą. Następnie uzyskane w ten sposób cDNA amplifikuje się z użyciem tradycyjnego PCR. Reakcja ta ma znacznie większą czułość w stosunku do tradycyjnego PCR [9].

Elektroforeza w gradiencie czynnika denaturującego (DGGE, ang. *Denaturing Gradient Gel Electrophoresis*) i w **gradiencie temperatury** (TGGE, ang. *Temperature Gradient Gel Electrophoresis*) są metodami pierwotnie projektowanymi do wykrywania pojedynczych mutacji w genetycznym materiale ludzkim. Równie świetnie sprawdzają się w badaniach prób środowiskowych, czyli w rozdziale produktów PCR, w których występuje mieszanina mikroorganizmów. Zastosowanie znalazły elektroforezy poliakrylamidowe, w których wykorzystywano: rosnące stężenie mocznika w DGGE oraz gradient temperatury w TGGE jako czynnik denaturujący strukturę DNA.

Cząsteczki DNA o różnej sekwencji, a zatem – różnej temperaturze topnienia, migrując w rosnącym stężeniu związku denaturującego (lub gradiencie temperatury), zatrzymują się na różnej wysokości. Ze względu na różnicę w sekwencji uzyskuje się w żelu tzw. *finger-print*, czyli wzór rozdziału mieszaniny na prążki, z których każdy odpowiada innemu fragmentowi namnożonego DNA.

Elektroforeza w pulsującym polu elektrycznym. Całe genomowe DNA czystych szczepów, poddane uprzednio pocięciu DNA enzymami restrykcyjnymi i zatopione w agarozie, można rozdzielić metodą elektroforezy w pulsującym polu elektrycznym (PFGE, ang. *Pulse Field Gel Electrophoresis*) [11]. Technika umożliwia precyzyjny rozdział dużych cząstek DNA dzięki zastosowaniu pulsującej zmiany kierunku przepływu prądu. Cząsteczka DNA ze względu na okresowe zmiany kierunku działania prądu wędruje „zygzakiem”, co umożliwia jej precyzyjny rozdział [12].

2.3. Klonowanie DNA [5, 13]

Klonowanie, podobnie jak reakcja PCR, pozwala na powielenie genów. W tym jednak wypadku wykorzystuje się bakteriofagi (wirusy bakteryjne) lub plazmidy (małe, koliste cząsteczki dwuniciowego DNA występujące u bakterii). Stanowią one swego rodzaju nośnik genu, który chcemy powielić i mają zdolność do samoreplikacji. Nośnik taki nazywany jest wektorem.

Zdolność do samoreplikacji jest bardzo ważnym czynnikiem, ponieważ samo wprowadzenie DNA do komórki bakteryjnej nie powoduje jego powielenia i w normalnych warunkach większość fragmentów wprowadzonego DNA szybko ulega degradacji przez nukleazy.

Zabieg klonowania można przeprowadzić, jeśli DNA poddawany klonowaniu został rozcięty enzymem restrykcyjnym, tak aby otrzymać kohezyjne końce w miejscu rozcięcia. Końce kohezyjne mają fragmenty jednoniciowe (tzw. lepkie końce), umożliwiające przyłączenie innego fragmentu DNA zawierającego komplementarne lepkie końce. W sytuacji, gdy fragment ma końce tępe (czyli takie, które nie zawierają wystającego fragmentu jednej nici DNA), konieczne jest zastosowanie odpowiedniego enzymu restrykcyjnego zarówno na fragment DNA, który chcemy powielić, jak i na wektorowy DNA, aby umożliwić połączenie tych cząstek w procesie ligacji, z użyciem enzymu zwanego ligazą. W wyniku ligacji powstaje hybryda będąca kolistym DNA złożona z DNA plazmidowego (lub fagowego) z wbudowanym fragmentem wprowadzonego DNA. Tak przygotowany wektor wprowadza się do komórek bakteryjnych w procesie transformacji (najczęściej wykorzystuje się tutaj kompetentne, czyli zdolne do transformacji komórki *E.coli*), gdzie może dojść do replikacji, czyli namnożenia powstałej hybrydy. Na tym etapie ważna jest umiejętność znalezienia poszukiwanego genu w powstałej mieszaninie zawierającej także DNA wektora i bakterii. Aby selekcja komórek zawierających hybrydę była możliwa, najczęściej stosuje się wektory

mające gen oporności na antybiotyki. Dzięki temu posianie mieszaniny komórek na płytce agarowej z dodatkiem odpowiedniego antybiotyku spowoduje wzrost wyłącznie komórek opornych na jego działanie, a więc tych, które zawierały wektor, a tym samym stworzoną hybrydę mającą w swoim składzie poszukiwany fragment DNA.

Produkt klonowania, tak jak produkt PCR, po oczyszczeniu może stanowić materiał do sekwencjonowania czy innych analiz.

Tabela 2

Odmiany technik elektroforetycznych

PFGE [11]	Całe bakteryjne (lub duże fragmenty genów eukariotycznych) DNA jest zatapiane w agarozie, a następnie poddawane cięciu restrykcyjnemu. Tak przygotowany materiał jest rozdzielany w polu elektrycznym, którego kierunek zmienia się okresowo. Pozwala to na uzyskanie precyzyjnego rozdziału DNA. Metoda jest uznawana za „złoty standard” pośród metod biotypowania mikroorganizmów.
DGGE/TGGE [11]	Rozdział mieszanin produktów PCR, takich samych w długości, ale różniących się sekwencją nukleotydów następuje w żelu poliakrylamidowym, w którym utworzono gradient czynnika denaturującego (stężenie mocznika lub temperatura). Użykuje się w ten sposób precyzyjny rozdział produktów.
Horyzontalna agarowa [15]	Metoda standardowego rozdziału mieszaniny DNA o różnej długości, od 5 do 5000 pz. Ma stosunkowo słabą moc rozdzielczą w porównaniu z innymi technikami elektroforetycznymi.
Poliakrylamidowa [15]	Żele poliakrylamidowe mają wysoką rozdzielczość w stosunku do techniki elektroforezy agarozowej. Są one stosowane m.in. w sekwencjonowaniu oraz w technice DGGE/TGGE. Polimeryzacja zachodzi dzięki użyciu nadsiarczanu amonowego, a reakcję katalizuje TEMED (N, N, N', N' – tetrametylenoetylenodiamina). Żele te są bardzo cienkie, co umożliwia równomierną polimeryzację.
SDS-PAGE [10]	Żele poliakrylamidowe zawierające SDS są stosowane w badaniach białek. Mieszaninę białek poddaje się najpierw działaniu czynnika redukującego, zrywającego wiązania dwusiarczkowe. Następnie SDS jako anionowy detergent powoduje denaturację i oplaśczenie białka, które naładowane ujemnie wędruje w kierunku katody. Technika ta pozwala na rozdział białek różniących się masą cząsteczkową.

2.4. Sekwencjonowanie kwasów nukleinowych [1, 10, 14–17]

W celu ustalenia kolejności nukleotydów w cząsteczkach kwasów nukleinowych przeprowadza się sekwencjonowanie. Aby poznać kolejność nukleotydów w cząsteczce RNA, należy najpierw uzyskać cDNA za pomocą odwrotnej transkrypcji. Do jednych z pierwszych procedur sekwencjonowania DNA zaliczyć można metodę terminacji łańcucha, zwaną również metodą Sangera lub dideoksy.

Materiał wyjściowy do sekwencjonowania metodą terminacji łańcucha stanowią: pula identycznych jednoniciowych cząsteczek DNA, odpowiednie startery oraz dideoksyrybonukleotydy, które po przyłączeniu do syntetyzowanej nici uniemożliwiają jej dalsze wydłu-

zanie, ponieważ w pozycji 3' nie mają grupy hydroksylowej, niezbędnej do utworzenia wiązania z kolejnym nukleotydem. Otrzymane w tej metodzie cząsteczki DNA rozdziela się w żelu poliakrylamidowym, a położenie prążków świadczy o rozmiarach uzyskanych fragmentów DNA.

Dla rozwoju techniki sekwencjonowania istotną okazała się możliwość znakowania fluorescencyjnego dideoksyrybonukleotydów, z których każdy wyznakowany jest innym fluoroforem, co umożliwia prowadzenie reakcji terminacji w jednej próbówce. Dzięki zdolności detektora fluorescencyjnego do rozróżniania poszczególnych znaczników fluorescencyjnych, można wprowadzać na jedną ścieżkę w żelu poliakrylamidowym cząsteczki wyznakowane różnymi fluoroforami. Pomimo postępu automatyzacji sekwencjonowania DNA istotną wadę standardowych procedur stanowiły ograniczenia dotyczące długości sekwencji odczytywanej w jednym eksperymencie.

Szybsze uzyskiwanie sekwencji osiągnięto przez zastosowanie rozdzielania cząsteczek w specjalnych kapilarach. Do zalet sekwencjonowania z zastosowaniem kapilar zaliczono: możliwość wymieniania polimeru rozdzielającego pomiędzy kolejnymi elektroforezami bez potrzeby rozmontowywania urządzenia, łatwość nakładania próbek, a także możliwość równoczesnej analizy kilkudziesięciu prób przy odpowiednim zagęszczeniu kapilar.

Jedną z metod pozwalających na dalsze zwiększenie efektywności sekwencjonowania jest pirosekwencjonowanie, które nie wymaga elektroforezy ani innej formy rozdzielania fragmentów DNA, bowiem w czasie syntezy nowej nici rejestrowana jest kolejność wbudowywanych nukleotydów, co umożliwia bezpośrednie, zautomatyzowane odczytanie sekwencji powstającej nici. Ponadto do mieszaniny reakcyjnej dodawane są dideoksyrybonukleotydy, a ich kolejne przyłączanie do polimeryzowanej nici wiąże się z uwolnieniem cząsteczki pirofosforanu, której przekształcenie za pomocą enzymu – sulfurylasy daje błysk światła będący wynikiem chemiluminescencji.

2.5. Hybrydyzacja *in situ* [1, 5, 16, 17]

Hybrydyzacja *in situ* jest techniką, w której łączy się krótki fragment DNA lub RNA o znanej sekwencji (tzw. sondę) z materiałem genetycznym zawartym w badanej próbce, o sekwencji komplementarnej do sondy. W celu zidentyfikowania hybrydy sondy znakuje się. Ze względu na różne sposoby prowadzenia hybrydyzacji wyróżnia się kilka jej typów:

- **Hybrydyzacja typu Southern Blot.** Do lokalizacji konkretnej sekwencji DNA na żelu po elektroforezie wykorzystuje się hybrydyzację typu Southern. Polega ona na dyfuzyjnym przenoszeniu DNA z żelu na dogodniejszy nośnik, membranę nitrocelulozową lub nylonową, którą inkubuje się ze znakowanymi izotopowo sondami o sekwencji komplementarnej do poszukiwanego fragmentu. Zdjęcie rentgenowskie membrany pozwala zlokalizować poszukiwaną sekwencję.
- **Hybrydyzacja typu Northern Blot.** Hybrydyzacja typu Northern, zwana też elektroforetyczno-hybrydyzacyjną detekcją transkryptów, jest metodą poszukiwania sekwencji RNA z użyciem znakowanych radioaktywnie sond DNA. Metoda pozwala na badanie aktywności pojedynczych genów.
- **Fluorescencyjna hybrydyzacja *in situ* (FISH).** Nazwa tej metody pochodzi od ang. *fluorescent in situ hybridization*, w skrócie FISH. Metoda ta służy do wykrywania określonej sekwencji DNA w badanym materiale za pomocą znakowanej sondy oligonukleotydowej. Identyfikacja hybrydy polega na identyfikacji znakowanych sond, które

wchodzą w skład hybrydy. Sondy znakowane są znacznikami fluorescencyjnymi, a ich obecność w próbce obserwuje się, stosując mikroskop fluorescencyjny. Sondy można zaprojektować samodzielnie na podstawie wcześniejszej analizy materiału genetycznego. Takie rozwiązanie stosuje się wówczas, gdy nie istnieje jeszcze sonda dla poszukiwanej sekwencji. Zaprojektowanie sondy wymaga zaawansowanej wiedzy z zakresu biologii molekularnej, przy czym dostępność sond oraz baz danych o sondach i sposobie ich zastosowania jest bardzo szeroka.

Próbki środowiskowe mogą zawierać elementy obdarzone zdolnością do „świecenia” pod wpływem promieniowania UV (tzw. autofluorescencja). Z tego względu niezbędne są badania wstępne mające na celu określenie wielkości autofluorescencji. Dlatego wykonuje się hybrydyzację próbek bez zastosowania sondy oraz z użyciem tzw. sondy nonsensownej, która nie wiąże prokariotycznego RNA. Sonda nonsensowna (ang. *nonsense probe*) to sonda stanowiąca sekwencję DNA, która nie ma sekwencji komplementarnej wśród organizmów prokariotycznych. Prowadząc analizy metodą FISH w celu identyfikacji docelowego organizmu, należy wykorzystać co najmniej dwie różne sondy, aby umożliwić zidentyfikowanie artefaktów i potwierdzić, że zidentyfikowana sekwencja (specyficzna dla danego organizmu) jest sekwencją poszukiwaną. I tak na przykład, by zidentyfikować gatunek *Kuenenia stuttgartiensis*, aktywny w procesie anammox, należało zastosować sondę charakterystyczną dla grupy bakterii anammox (np. sondę Amx820) oraz sondę zawierającą sekwencję charakterystyczną dla tego gatunku. Sygnał fluorescencyjny z obydwu sond pozwoli na jednoznaczną identyfikację tego gatunku.

Tabela 3

Modyfikacje FISH [17]

CARD-FISH (CARD – z ang. <i>Catalysed Reporter Deposition</i>)	Metoda stosowana, gdy ilość rybosomów w próbce jest zbyt mała, co uniemożliwia detekcję komórek docelowych. W metodzie tej sygnał zostaje wzmocniony dzięki użyciu HRP (peroksydaza chrzanowa, ang. <i>horseradish peroxidase</i>) i tyramidu (ang. <i>Tyramide Signal Amplification</i>).
Clone-FISH	Metoda stosowana wówczas, gdy konieczne jest zaprojektowanie sondy a organizm docelowy jest niedostępny, oraz przeszukiwanie biblioteki genów ze względu na czasochłonność i kosztowność zostaje wykluczone. Metoda polega na wywołaniu ekspresji docelowego genu 16S rRNA w <i>E.coli</i> , a następnie detekcji za pomocą FISH. Stanowi ona bardzo dobre narzędzie do zaprojektowania sondy.
Cat-FISH	Podobnie jak Clone-FISH stosowana w celu zaprojektowania sondy.
RING-FISH (ang. <i>Recognition of Individual Genes in a single bacterial cell</i>)	Stosowana ze względu na zbyt małą czułość techniki FISH do identyfikacji pojedynczych genów.
FISH-MAR (ang. <i>FISH-microautoradiography</i>)	Połączenie dwóch metod <i>in situ</i> : FISH i mikroautoradiografii. Mikroautoradiografia polega na znakowaniu radioizotopowym substratów organicznych i nieorganicznych (np. ^3H , ^{14}C , ^{35}S , ^{33}P), których umiejscowienie określa się następnie za pomocą obserwacji mikroskopowych. W tandemie z FISH pozwala na określenie poboru przez poszczególne mikroorganizmy badanych substratów zawartych w próbce.

Technika FISH pozwala nie tylko na identyfikację organizmów, ale także na analizę ilościową z zastosowaniem fluorescencyjnego skaningowego mikroskopu konfokalnego (ang. *confocal scanning laser microscope*, CSLM). Analiza ilościowa oparta jest na obróbce zdjęć mikroskopowych badanego materiału z użyciem zaawansowanego oprogramowania, niekiedy dostępnego bezpłatnie (np. program DAIME, ang. *Digital Image Analysis In Microbial Ecology*). W analizie obrazu mikroskopowego obok detekcji szukanego organizmu możliwa jest także detekcja wszystkich bakterii (najczęściej), co pozwala na podawanie wyników w odniesieniu do całkowitej biomasy bakterii. Możliwa jest również analiza ilościowa w przeliczeniu na masę próbki, jednak wówczas należy zastosować odpowiednie filtry, stanowiące nośnik, na którym przeprowadza się hybrydyzację.

Obecnie istnieje wiele modyfikacji i udoskonaleń metody FISH, które zostały przedstawione w tab. 3.

2.6. Mikromacierze DNA [18]

Zasada działania mikromacierzy jest stosunkowo prosta i oparta na technikach hybrydyzacji. W mikromacierzach, odwrotnie niż w wypadku wcześniej omówionej techniki FISH, sondy DNA umieszczane są na stałym podłożu, na które nakłada się wyznakowaną fluorescencyjnie próbę pochodzącą z badanego materiału biologicznego. Na podłożu można nanieść nawet kilkadziesiąt tysięcy sond, dzięki czemu w jednym eksperymencie można przeanalizować ekspresję bardzo wielu genów.

Ze względu na charakter zastosowanych sond wyróżnia się dwa rodzaje mikromacierzy: mikromacierze cDNA oraz mikromacierze oligonukleotydowe (tzw. chipy DNA).

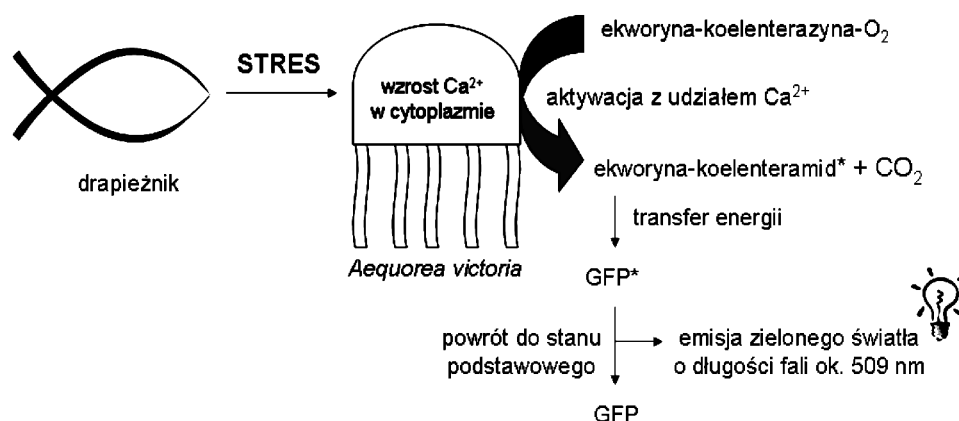
Na analizę z wykorzystaniem mikromacierzy składa się kilka etapów: otrzymanie sond i przygotowanie mikromacierzy, izolacja materiału genetycznego i jego wyznakowanie, hybrydyzacja do sond DNA znajdujących się na mikromacierzy oraz zebranie i analiza wyników hybrydyzacji.

Ponieważ procedura projektowania i przygotowania mikromacierzy oraz analiza danych są czasochłonne i wymagają doświadczenia, proponuje się korzystanie z gotowych chipów DNA, oferowanych przez firmy biotechnologiczne. Technika ta wykorzystywana jest głównie w medycynie do badania poziomu ekspresji genów. Ze względu na wysokie koszty mikromacierze rzadko wykorzystywane są w biotechnologii środowiskowej. Więcej informacji o mikromacierzach w języku polskim znaleźć można w publikacji [18].

2.7. Białko GFP

Naturalna zdolność bioluminescencji niektórych gatunków parzydełkowców (*Cnidaria*) od wieków wzbudzała zainteresowanie człowieka. Białko GFP znalazło się w centrum dociekań wielu naukowców i obecnie stanowi powszechnie wykorzystywane narzędzie w biologii molekularnej oraz w biologii komórki. Najlepiej poznanym i najczęściej stosowanym białkiem fluorescencyjnym jest GFP pochodzące z *Aequorea victoria*. Badania dotyczące opracowania mechanizmu bioluminescencji u *A. victoria* na poziomie molekularnym wykazały, że w reakcji uczestniczą dwa białka: ekworyna (ang. *aequorin*) oraz zielone białko fluorescencyjne (ang. *green fluorescent protein*, GFP) – między nimi zachodzi transfer energetyczny, dzięki któremu następuje emisja światła [19] (rys. 2).

Masa cząsteczkowa białka wynosi ok. 27 kDa, a struktura przyjmuje formę β -baryłki. Poszczególne harmonijki układają się względem siebie antyrównolegle, formując ściany zwartej cylindra. Po obu stronach baryłki łańcuch polipeptydowy tworzy pętle zabezpieczające wnętrze struktury, która zawiera grupę fluoroforową. Na podstawie wyników badań dotyczących właściwości spektralnych GFP pochodzącego z *Aequorea victoria* stwierdzono, że widmo absorpcji ma dwa maksima – główne przy 395 nm i dodatkowe przy 470 nm, natomiast widmo fluorescencyjnej emisji ma jedno maksimum przy 509 nm [19, 20].



Rys. 1. Schemat mechanizmu bioluminescencji

Fig. 1. Scheme of bioluminescence mechanism

Modyfikacje białka dotyczące struktury molekularnej białka GFP, głównie poprzez wprowadzanie przypadkowych mutacji, ułatwiły i rozszerzyły jego wykorzystanie w badaniach biologicznych. Opracowano sposoby zwiększenia intensywności fluorescencji GFP oraz dokonano zmian w długości emitowanego światła, czyli barwy światła, w jakim zmutowane białka świecą [20].

Obecnie najpowszechniejszą formą wykorzystania GFP jest badanie lokalizacji białek w komórkach [21]. W tym celu projektuje się tzw. białka fuzyjne. Powstają one w wyniku transkrypcji i translacji sekwencji DNA, składającego się z cDNA GFP i genu kodującego badane białko. Dzięki łatwej wizualizacji możliwe jest śledzenie zmian lokalizacji badanych białek pod wpływem różnych czynników. GFP stosuje się również jako gen reportery, służący do monitorowania poziomu ekspresji genów [22].

Doniesienia zawarte w literaturze przedmiotu z ostatnich lat wskazują, że białko GFP coraz częściej znajduje zastosowanie w biotechnologii środowiskowej [19]. W związku z łatwą wizualizacją znakowanych mikroorganizmów dzięki mikroskopii fluorescencyjnej oraz ze względu na liczne zalety, które przedstawiono w tab. 4 białko to może być wykorzystywane do badania dynamiki rozmnażania i/lub przestrzennej lokalizacji bakterii w różnych środowiskach, m.in. takich, jak gleba, biofilm czy osad czynny.

Znakowane genem *gfp* mikroorganizmy mogą posłużyć do monitorowania procesu bioremediacji skażonych gleb [23]. Wiele przeprowadzonych dotąd badań dotyczyło wpływu węglowodorów aromatycznych na ilość, zdolność przetrwania i przestrzenne rozmieszczenie

bakterii zdolnych do rozkładu tych związków. Metoda znakowania genem *gfp* może być zastosowana do badania rozmieszczenia poszczególnych gatunków, a także może posłużyć do monitorowania zmian zachodzących w zespołach bakteryjnych tworzących biofilmy [24]. Technika znakowania genem *gfp* pozwala na obserwowanie zależności między poszczególnymi gatunkami bakterii, dzięki czemu możliwe jest ustalenie właściwości biofilmu i podjęcie prób jego modyfikacji na potrzeby danego procesu.

Tabela 4

Zalety oraz wady wykorzystywania GFP jako znacznika w badaniach środowiskowych [20]

ZALETY

- łatwość detekcji – do wykrycia ekspresji nie potrzeba egzogennych substratów, kofaktorów lub energii chemicznej,
- możliwość monitorowania pojedynczych komórek bakteryjnych,
- niska destruktywność – detekcja może odbywać się bez niszczenia struktur złożonych z mikroorganizmów,
- wykrywanie znaczonych komórek odbywa się bez ich wcześniejszego barwienia,
- możliwość detekcji on-line bądź w czasie rzeczywistym,
- stabilność sygnału:
 - GFP jest odporne na denaturację termiczną i utrzymuje fluorescencję do temperatury ok. 65°C,
 - GFP wykazuje odporność na denaturację chemiczną i wykazuje fluorescencję w zakresie pH 6–12,
 - GFP ze względu na zwartą strukturę nie ulega działaniu wielu enzymów proteolitycznych, m.in. trypsyny, chymotrypsyny, subtylizyny, papainy aż do stężenia 1 mg/ml,
 - GFP poddane działaniu bardzo wysokiego ciśnienia, aż do 600 MPa (ok. 6 tys. atmosfer), w dalszym ciągu utrzymuje stały poziom fluorescencji,
- minimalny wpływ na dynamikę procesów zachodzących na powierzchni komórek ze względu na ekspresję GFP zachodzącą w cytoplazmie,
- ciągła synteza GFP w komórkach – minimalne obniżenie sygnału fluorescencji podczas bakteryjnej replikacji,
- możliwość detekcji sygnału pochodzącego z żywych komórek – powtarzalne odczyty w tych samych warunkach dla tych samych komórek,
- brak tła emitowanego przez autochtoniczne populacje bakteryjne zakłócającego detekcję,
- możliwa podwójna detekcja ze znacznikami emitującymi światło o innych długościach fal (innego koloru).

WADY

- niezbadana zmienność ekspresji GFP w komórkach różnych gatunków,
- niestabilność plazmidów zawierających geny kodujące GFP (bardziej stabilne są inserty wprowadzone w chromosom bakteryjny – w ten sposób możliwe jest obniżenie ryzyka transferu genu kodującego GFP do genomów bakterii autochtonicznych),
- niezbadany wpływ czynników środowiskowych na ekspresję GFP,
- możliwość zakłócenia sygnału emitowanego przez GFP przez inne cząsteczki wykazujące zdolność fluorescencji w komórkach bakterii,
- brak zdolności GFP do emitowania sygnału w warunkach beztlenowych,
- potrzeba wyznaczenia czasu życia komórkom zawierającym gen kodujący GFP.

Wykorzystanie znakowanych genem *gfp* szczepów *Escherichia coli* oraz *Serratia marcescens* pozwoliło natomiast na zbadanie mechanizmu adhezji komórek bakteryjnych do powierzchni kłaczków osadu czynnego [25]. Dzięki zastosowaniu mikroskopii konfokalnej do obserwacji znakowanych komórek możliwe było utworzenie trójwymiarowego modelu, na podstawie którego wykazano odmienne mechanizmy przytwierdzenia się badanych szczepów do powierzchni kłaczków oraz ich zdolność do przedostawania się do wnętrza kłaczków przez specyficzne kanały w ich strukturze.

Istnieje również możliwość skonstruowania całokomórkowych biosensorów bakteryjnych przez przeprowadzenie fuzji genu *gfp* z określoną sekwencją promotorową [26–28]. W komórce mającej czynny transkrypcyjnie gen promotor pełni rolę bioreceptora reagującego na zmiany zachodzące w obrębie komórki, które są skutkiem wpływu określonych czynników. Ekspresja genu *gfp*, obserwowana jako światło, jest formą odpowiedzi komórki, a intensywność emitowanego światła stanowi specyficzny wskaźnik reakcji komórki na badany czynnik. Dodatkowo struktura promotora, a także mechanizm regulacji jego aktywności decydują o transkrypcji genu *gfp* znajdującego się pod jego kontrolą, co pozwala na przeprowadzenie badań dotyczących ekspresji genów będących pod kontrolą różnych regionów promotorowych. Biosensory tego rodzaju znajdują coraz szersze zastosowanie w wykrywaniu szkodliwych związków chemicznych oraz ocenie biodostępności i potencjalnej toksyczności substancji występujących w ściekach, wodzie czy glebie.

3. Podsumowanie

W artykule przedstawiono przegląd najbardziej podstawowych metod molekularnych użytecznych w biotechnologii środowiskowej, przy czym należy zwrócić uwagę na ich uniwersalność. Mogą być one zastosowane do badania praktycznie każdego materiału biologicznego, wymagając jedynie drobnych dostosowań procedur laboratoryjnych. W biotechnologii środowiskowej użycie technik molekularnych ułatwia analizy mikroorganizmów, trudnych do zbadania konwencjonalnymi metodami mikrobiologicznymi, ze względu na skomplikowane profile biochemiczne lub problemy w ich hodowli. Biotechnologia jest przyszłościową i wciąż rozwijającą się gałęzią wiedzy, a główną siłą napędową tego rozwoju w ostatnich latach okazała się biologia molekularna. Techniki te nie są ograniczone jedynie do prac zespołów biologów, biochemików czy mikrobiologów, ale mogą być podejmowane również przez biotechnologów i inżynierów. Życzymy zatem owocnych badań.

Literatura

- [1] Buchowicz J., *Biotechnologia molekularna*, PWN, Warszawa 2007.
- [2] Harms G., Layton A., Dionisi H., Gregory I., Garrett V., Hawkins S., Robinson K., Saley G., *Real-time PCR quantification of nitrifying bacteria in a municipal water treatment plant*, Environ. Sci. Technol. 37 (2), 2003, 343-351.
- [3] Goerke Ch., Bayer M.G., Wolz Ch., *Quantification of Bacterial Transcripts during Infection Using Competitive Reverse Transcription-PCR (RT-PCR) and LightCycler RT-PCR*, Clinical And Diagnostic Laboratory Immunology 8(2), 2001, 279-282.

- [4] Moreira D., *Efficient removal of PCR inhibitors using agarose-embedded DNA preparations*, Nucleic Acids Research 26(13), 1998, 3309-3310.
- [5] Węgleński P. (red.), *Genetyka molekularna*, PWN, Warszawa 2006.
- [6] Dovich N.J., *DNA sequencing by capillary electrophoresis*, Electrophoresis 18, 1997, 2393-2399.
- [7] Dolnik V., *DNA sequencing by capillary electrophoresis (review)*, J. Biochem. Biophys. Methods 41, 1999, 103-119.
- [8] Kowalchuk G.A., Naoumenko Z.S., Derikx P.J.L., Felske A., Stephen J.R., Arkhipchenko I.A., *Applied Environmental Microbiology* 65(2), 1999, 396-403.
- [9] Williams J., Kubelik A., Livak K., Rafalsky J., Tingey S., *DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are useful genetic markers*, Nucleic Acids Res. 18, 1990, 7213-7218.
- [10] Hames B., Hooper N., Houghton J., *Krótkie wykłady z biochemii*, PWN, Warszawa 2002.
- [11] Olive D.M., Bean P., *Principles and Applications of Methods for DNA-Based Typing of Microbial Organisms*, Journal of Clinical Microbiology 37(6), 1999, 1661-1669.
- [12] Yavuz E., Gunes H., Harsa S., Bulut C., Yenidunya A., *Optimization of pulsed field gel electrophoresis (PFGE) conditions for thermophilic bacilli*, World Journal of Microbiology and Biotechnology 20, 2004, 871-874.
- [13] Turner P., McLennen A., Bates A., White M., *Biologia molekularna – krótkie wykłady*, PWN, Warszawa 1999.
- [14] Dorigo U., Volatier L., Humbert J.-F., *Molecular approach to the assessment of biodiversity in aquatic microbial communities*, Water Research 39, 2005, 2207-2218.
- [15] Brown T., *Genomy*, PWN, Warszawa 2001.
- [16] Daims H., Stoecker K., Wagner M., *Fluorescence in situ hybridization for the detection of prokaryotes*, [in:] *Advanced methods in molecular microbial ecology*, Osborn A.M., Smith C.J. (eds.), Bios-Garland, Abingdon, UK, 2005, 213-239.
- [17] Wagner M., Horn M., Daims H., *Fluorescence in situ hybridisation for the identification and characterisation of prokaryotes*, Current Opinion in Microbiology 6, 2003, 302-309.
- [18] Kisiel A., Skąpska A., Markiewicz W., Figlerowicz M., *Mikromacie-rze DNA*, Kosmos 3-4, 2003, 295-303.
- [19] Kendall J.M., Badminton M.N., *Aequorea victoria bioluminescence moves into an exciting new era*, Trends Biotechnol. 16, 1998, 216-224.
- [20] Errampalli D., Leung K., Cassidy M.B., Kostrzynska M., Blears M., Lee H., Trevors J.T., *Applications of the green fluorescent protein as a molecular marker in environmental microorganisms*, Journal of Microbiological Methods 35, 1999, 187-199.
- [21] Bastos A.E.R., Cassidy M.B., Trevors J.T., Lee H., Rossi A., *Introduction of green fluorescent protein gene into phenol-degrading Alcaligenes faecalis cells and their monitoring in phenol-contaminated soil*, Appl. Microbiol. Biotechnol. 56, 2001, 225-260.

- [22] Skillman L.C., Sutherland I.W., Jones M.V., Goulsbra A., *Green fluorescent protein as a novel species-specific marker in enteric dual-species biofilms*, Microbiology 144, 1998, 2095-2101.
- [23] Olofsson A.C., Zita A., Hermansson M., *Floc stability and adhesion of green-fluorescent-protein-marked bacteria to flocs in activated sludge*, Microbiology, 144, 1998, 519-528.
- [24] Yagi K., *Applications of whole-cell bacterial sensors in biotechnology and environmental science*, Appl. Microbiol. Biotechnol. 73, 2007, 1251-1258.
- [25] Matejczyk M., *Bakteryjne biosensory*, Post. Mikrobiol. 43(2), 2004, 155-165.
- [26] Lei Y., Chen W., Mulchandani A., *Microbial biosensors*, Analytica Chimica Acta 568, 2006, 200-210.